

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 108**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2011 PCT/EP2011/056388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11131746**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2011 E 11716882 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024 EP 2560993**

54 Título: **Proteínas que contienen FC de anticuerpos heterodiméricos y métodos para producir las mismas**

30 Prioridad:

24.11.2010 DK 201001066

20.04.2010 DK 201000330

20.04.2010 US 326082 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2024

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)

Carl Jacobsens Vej 30

2500 Valby, DK

72 Inventor/es:

LABRIJN, ARAN, FRANK;

MEESTERS, JOYCE;

BREMER, EWALD VAN DEN;

NEIJSEN, JOOST, J.;

BERKEL, PATRICK VAN;

GOEIJ, BART DE;

VINK, TOM;

VAN DE WINKEL, JAN;

SCHUURMAN, JANINE y

PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 989 108 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas que contienen FC de anticuerpos heterodiméricos y métodos para producir las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos novedosos y a métodos novedosos para producir dichos anticuerpos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos monoclonales se han convertido en los últimos años en moléculas terapéuticas de éxito, en particular para el tratamiento del cáncer. Por desgracia, sin embargo, los anticuerpos monoclonales con frecuencia no pueden curar enfermedades cuando se usan como monoterapia. Los anticuerpos biespecíficos pueden potencialmente
15 superar algunas de las limitaciones de la terapia con anticuerpos monoclonales, por ejemplo, podrían usarse como mediadores para dirigir un fármaco o un compuesto tóxico a células diana, como mediadores para redirigir mecanismos efectores a sitios asociados a enfermedad o como mediadores para aumentar la especificidad para células tumorales, por ejemplo, mediante la unión a una combinación de moléculas diana que se encuentra exclusivamente en las células tumorales.

Chames y Baty (2009) *Curr Opin Drug Disc Dev* 12: 276 revisaron recientemente diferentes formatos y usos de anticuerpos biespecíficos. Uno de los principales obstáculos en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos ha sido la dificultad de producir el material en calidad y cantidad suficientes mediante tecnologías tradicionales, tales como el
20 hibridoma híbrido y métodos de conjugación química (Marvin y Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin* 26:649). La coexpresión en una célula hospedadora de dos anticuerpos, que consisten en diferentes cadenas pesadas y ligeras, conduce a una mezcla de posibles productos de anticuerpos además del anticuerpo biespecífico deseado.

Se han descrito varias estrategias para favorecer la formación de un producto heterodimérico, es decir, biespecífico, tras la coexpresión de diferentes construcciones de anticuerpos.

Lindhofer *et al.* (1995 *J Immunol* 155:219) han descrito que la fusión de hibridomas de rata y ratón que producen diferentes anticuerpos conduce al enriquecimiento de anticuerpos biespecíficos funcionales, debido al emparejamiento preferente de cadenas pesadas/ligeras restringidas por especies. Otra estrategia para promover la formación de heterodímeros sobre homodímeros es una estrategia de "botón en ojal" en la que se introduce una protuberancia en la interfaz de un primer polipéptido de cadena pesada y una cavidad correspondiente en la interfaz de un segundo polipéptido de cadena pesada, de manera que la protuberancia pueda posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímeros e impedir la formación de homodímeros. Las "protuberancias" se construyen reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes. Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (patente de los EE. UU. 5.731.168). Los documentos EP1870459 (Chugai) y WO 2009089004 (Amgen) describen otras estrategias para favorecer la formación de heterodímeros tras la coexpresión de diferentes dominios de anticuerpos en una célula hospedadora. En estos métodos, uno o más restos que constituyen la interfaz CH3-CH3 en ambos dominios CH3 se reemplazan por un aminoácido cargado de manera que la formación de homodímeros es electrostáticamente desfavorable y la heterodimerización es electrostáticamente favorable. El documento WO2007110205 (Merck) describe otra estrategia más, en donde se aprovechan las diferencias entre los dominios CH3 de IgA e IgG para promover la heterodimerización.

Dall'acqua *et al.* (1998 *Biochemistry* 37:9266) han identificado cinco restos de aminoácidos energéticamente clave (366, 368, 405, 407 y 409) que están implicados en el contacto CH3-CH3 en la interfaz de un homodímero de CH3.

El documento WO 2008119353 (Genmab) describe un método *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos en donde un anticuerpo biespecífico se forma mediante intercambio de "brazos Fab" o "media molécula" (intercambio de una cadena pesada y una cadena ligera fijada) entre dos anticuerpos IgG4 o similares a IgG4 monoespecíficos tras incubación en condiciones reductoras. Esta reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y disociación-asociación de dominios CH3 en donde los enlaces disulfuro de cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos (originariamente monoespecíficos) progenitores se reducen y las cisteínas libres resultantes forman un enlace disulfuro entre cadenas pesadas con restos cisteína de otra molécula de anticuerpo progenitor (originariamente con una especificidad diferente), y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos progenitores se liberan y se reforman por disociación-asociación. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que potencialmente son secuencias diferentes compuestas. Cabe señalar que, sin embargo, el proceso es aleatorio y el intercambio de brazos Fab también puede producirse entre dos moléculas con secuencia idéntica o dos moléculas biespecíficas pueden participar en el intercambio de brazos Fab para regenerar anticuerpos que comprenden la especificidad del anticuerpo progenitor monoespecífico original.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que mediante la introducción de mutaciones asimétricas en las regiones

CH3 de los dos anticuerpos de partida monoespecíficos, la reacción de intercambio de brazos Fab puede forzarse para que se vuelva direccional y de este modo producir anticuerpos biespecíficos altamente estables.

Sumario de la invención

La información técnica que se establece a continuación, en algunos aspectos, puede ir más allá de la definición de la invención, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para ubicar la invención real en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no está dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forma parte de la invención.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* eficiente para la producción de anticuerpos biespecíficos altamente estables sobre la base de anticuerpos monoespecíficos homodiméricos estables como materiales de partida. Por ejemplo, puede formarse un anticuerpo biespecífico altamente estable con alto rendimiento y pureza sobre la base de dos anticuerpos monoespecíficos estables como material de partida.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para generar un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- a) proporcionar un primer anticuerpo monoespecífico homodimérico que comprende una región Fc de inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3, en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,
 - b) proporcionar un segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico que comprende una región Fc de inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3, en donde dicho segundo anticuerpo monoespecífico comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,
- en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico se une a un primer epítipo y dichos segundos anticuerpos monoespecíficos se unen a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes,
- c) incubar dicho primer anticuerpo monoespecífico junto con dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la secuencia Cys-Pro-Pro-Cys de la región bisagra central experimenten isomerización de enlace disulfuro, y
 - d) obtener dicha proteína heterodimérica.

En una realización, la región Fc del primer anticuerpo monoespecífico es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en donde la región Fc del segundo anticuerpo monoespecífico es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.

En otra realización, las regiones Fc de ambos de dichos anticuerpos monoespecíficos primero y segundo son del isotipo IgG1.

- En una realización adicional, la interacción heterodimérica en el anticuerpo biespecífico resultante es
- a) de manera que no pueda producirse ningún intercambio de brazos Fab a 0,5 mM de glutatión en las condiciones descritas en el Ejemplo 13, y/o
 - b) de manera que no se produzca ningún intercambio de brazos Fab *in vivo* en ratones en las condiciones descritas en el Ejemplo 14, y/o
 - c) más de dos veces más fuerte, tal como más de tres veces más fuerte, por ejemplo, más de cinco veces más fuerte que la más fuerte de las dos interacciones homodiméricas, por ejemplo, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 30.

En una realización adicional, las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son de manera que

- a) la constante de disociación de los heterodímeros del anticuerpo biespecífico resultante es inferior a 0,05 micromolar cuando se somete a ensayo como se describe en el Ejemplo 30, y/o
- b) las constantes de disociación de ambos homodímeros de los anticuerpos monoespecíficos primero y segundo son superiores a 0,01 micromolar, tal como superiores a 0,05 micromolar, preferentemente entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, incluso más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 micromolar cuando se someten a ensayo como se describe en el Ejemplo 21.

En una realización, dicho primer anticuerpo monoespecífico homodimérico no tiene más de una sustitución de aminoácido en la región CH3, y el segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico no tiene más de una sustitución de aminoácido en la región CH3 con respecto a las regiones CH3 de tipo silvestre.

En otra realización, dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ I D NO: 1.

5 En una realización adicional, dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo, excepto por cualquier mutación especificada, son anticuerpos humanos o humanizados.

En otra realización, ambos de dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo comprenden además una cadena ligera.

10 En una realización adicional, dicho primer y/o dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn.

En una realización, dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo proporcionados en la etapa a) y b) se purifican.

15 En otra realización, dicho primer y/o segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico se conjuga con un fármaco, un profármaco o una toxina o contiene un grupo aceptor para el mismo.

20 En una realización particular, dicho primer y/o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral; dicho primer o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral y el otro epítipo se ubica en una célula efectora; dicho primer o segundo epítipo se ubica en un linfocito T, tal como en CD3 expresado en un linfocito T; el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítopos en la misma célula tumoral; o el primer anticuerpo se une a un epítipo en una célula tumoral, y el otro anticuerpo es un anticuerpo irrelevante o inactivo sin ninguna actividad de unión *in vivo* relevante para la aplicación prevista.

25 En una realización, las condiciones reductoras en la etapa c) comprenden la adición de un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina o derivados químicos de los mismos, ditioglicerol, glutatión, L-cisteína y beta-mercaptoetanol.

30 En una realización adicional, la etapa c) se realiza en condiciones reductoras con un potencial redox entre -150 y -600 mV, tal como entre -250 y -400 mV.

En una realización adicional más, la etapa c) comprende la incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de 2-mercaptoetilamina al menos 25 mM o en presencia de ditiotreitól al menos 0,5 mM.

35 En otra realización, la etapa d) comprende la eliminación de un agente reductor, por ejemplo, mediante desalación.

40 El método puede usarse, por ejemplo, para la producción *in vitro* de anticuerpos biespecíficos, para diversos usos, tales como usos terapéuticos o de diagnóstico. Una ventaja de este método *in vitro* consiste en que el emparejamiento de cadena pesada/cadena ligera permanece intacto durante la reacción, de esta forma no se obtienen combinaciones no deseadas de cadena pesada y cadenas ligeras en el producto. Esto contrasta con algunos de los métodos de coexpresión descritos en la técnica anterior (véase anteriormente) donde se necesita encontrar una cadena ligera común que pueda formar un anticuerpo funcional con ambas cadenas pesadas con el fin de evitar la formación de productos de cadena pesada/cadena ligera no funcionales, debido al emparejamiento aleatorio de cadena pesada/cadena ligera en la célula. Además, el proceso *in vitro* puede realizarse en el laboratorio lo que permite mayor control, flexibilidad y rendimiento de la proteína heterodimérica que lo permitido por la coexpresión.

50 El método *in vitro* de la invención también puede usarse para crear bibliotecas de compuestos de mayor tamaño, por ejemplo, en un método de cribado para identificar combinaciones ventajosas de especificidades. Por ejemplo, para algunas combinaciones de dianas de anticuerpos, no cualquier anticuerpo biespecífico será funcional, es decir, capaz de unirse a ambas dianas al mismo tiempo y mediar los efectos funcionales deseados. En dichos casos, un anticuerpo biespecífico que tiene una propiedad deseada, por ejemplo, unión a la diana o destrucción celular óptimas, puede identificarse por:

- 55 a) proporcionar un primer conjunto de anticuerpos homodiméricos que tienen regiones variables diferentes y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, en donde dichos anticuerpos de dicho primer conjunto comprenden primeras regiones CH3 idénticas, en donde dichas regiones CH3 comprenden una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU),
- 60 b) proporcionar un segundo conjunto de anticuerpos homodiméricos que tiene regiones variables diferentes o regiones variables idénticas, en donde dichos anticuerpos de dicho segundo conjunto comprenden segundas regiones CH3 idénticas, en donde dichas regiones CH3 comprenden una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU), en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dichos anticuerpos homodiméricos primero y segundo se unen a epítopos diferentes,
- 65 c) incubar combinaciones de anticuerpos de dicho primer conjunto y de dicho segundo conjunto en condiciones

reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las regiones bisagra experimenten isomerización de enlace disulfuro, generando de este modo un conjunto de anticuerpos biespecíficos,

d) restablecer opcionalmente las condiciones a no reductoras,

e) someter a ensayo el conjunto resultante de anticuerpos biespecíficos para una propiedad deseada dada, y

f) seleccionar un anticuerpo biespecífico que tenga la propiedad deseada.

En aspectos adicionales, la presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos obtenidos u obtenibles mediante los métodos anteriores de la invención y a métodos para producir anticuerpos biespecíficos de la invención mediante coexpresión en una célula hospedadora adecuada.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) proporcionar una primera construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una primera cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo que comprende una primera región CH3 que comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU) y que comprende además una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,

b) proporcionar una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una segunda cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo que comprende una segunda región CH3 que comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU) y que comprende además una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,

c) coexpresar dichas construcciones de ácido nucleico primera y segunda en una célula hospedadora, y

d) obtener dicho anticuerpo biespecífico a partir del cultivo celular;

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dicha primera cadena pesada de longitud completa se une a un primer epítipo y dicha segunda cadena pesada de longitud completa se une a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes.

Además, se proporciona un vector de expresión que comprende las construcciones de ácido nucleico especificadas en el presente documento, una célula hospedadora que comprende las construcciones de ácido nucleico especificadas en el presente documento.

En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido que comprende una primera cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que comprende una primera región Fc que comprende una primera región CH3, y un segundo polipéptido que comprende una segunda región Fc que comprende una segunda cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que comprende una segunda región CH3,

en donde dicha primera cadena pesada se une a un primer epítipo y dicha segunda cadena pesada se une a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes, y en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y

a) en donde dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, y

b) en donde dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central.

En una realización, la primera región Fc es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y en donde la segunda región Fc es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.

En una realización adicional, tanto dicha primera como dicha segunda región Fc son del isotipo IgG1.

En una realización adicional, dicha primera región CH3 no tiene más de una sustitución de aminoácido, y la segunda región CH3 no tiene más de una sustitución de aminoácido con respecto a las regiones CH3 de tipo silvestre.

En una realización, dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ I D NO: 1.

En otra realización, dichas cadenas pesadas de longitud completa primera y segunda, excepto por cualquier mutación especificada, son de un anticuerpo humano o humanizado.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico comprende además dos cadenas ligeras de longitud completa.

Incluso en una realización adicional, dicho primer y/o dicho segundo polipéptido comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn.

En otra realización, dicho primer y/o segundo polipéptido se conjuga con un fármaco, un profármaco o una toxina o contiene un grupo aceptor para el mismo.

- 5 En una realización particular, dicho primer y/o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral; dicho primer o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral y el otro epítipo se ubica en una célula efectora; dicho primer o segundo epítipo se ubica en un linfocito T, tal como en CD3 expresado en un linfocito T; la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se unen a diferentes epítopos en la misma célula tumoral; o la primera cadena pesada se une a un epítipo en una célula tumoral, y la otra cadena pesada es de un anticuerpo irrelevante o inactivo sin ninguna actividad de unión *in vivo* relevante para la aplicación prevista.

En otra realización, dichos epítopos primero y segundo se ubican en una célula tumoral y en donde el anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una diana seleccionada del grupo que consiste en: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de la envoltura de HERV, perostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM y MRP3.

En una realización adicional, dichos epítopos primero y segundo se ubican en una célula tumoral y en donde dicho anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una combinación diana seleccionada del grupo que consiste en: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

Incluso en una realización adicional, dicho primer segundo epítipo se ubica en una célula tumoral y el otro epítipo se ubica en una célula efectora, en donde el anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una diana seleccionada del grupo que consiste en: FcγRI (CD64), FcγRIII (CD16), CD3, CD89, CD32a, FcεRI.

En otra realización más, dicho anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una combinación diana seleccionada de: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA de clase II, CD38 + CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + brazo no de unión y combinaciones de receptores acoplados a proteína G.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab entre especies. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por GSH entre los anticuerpos IgG4 contra EGFR (2F8) y CD20 (7D8) indicados se determinó mediante un ELISA. En el ELISA se analizó una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-1 µg/ml. La unión biespecífica fue superior después del intercambio de brazos Fab entre anticuerpos IgG4 de macaco de la India (Rh) y humanos (Hu) que entre dos anticuerpos de la misma especie.

Figura 2: Alineación de las secuencias de aminoácidos de la bisagra central (es decir, la secuencia CPPC en IgG1 humana que incluye los dos restos cisteína que potencialmente forman los enlaces disulfuro de cadena pesada y restos correspondientes en otros isotipos humanos u otras especies) y la interfaz CH3-CH3 de los isotipos de anticuerpos humanos y de macaco de la India.

Figura 3: Generación de anticuerpos biespecíficos usando IgG1 humana mutante que participa en el intercambio de brazos Fab. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por GSH entre el anticuerpo IgG4 contra CD20 (7D8) humano y los anticuerpos IgG1 contra EGFR (2F8) humanos indicados se determinó mediante un ELISA. El gráfico presentado muestra los números promedio de tres experimentos de intercambio de brazos Fab independientes, en los que se usó una concentración de anticuerpos total de 1 µg/ml para el ELISA. La unión biespecífica fue superior después del intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-CPSC-ITL e IgG4-7D8 que entre dos anticuerpos IgG4. La combinación de IgG4-7D8 con IgG1-2F8-CPSC o IgG1-2F8-ITL no dio como resultado anticuerpos biespecíficos en las condiciones utilizadas.

Figura 4: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab *in vivo* de anticuerpos IgG4 humanos e IgG1 mutantes. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vivo* en ratones inmunodeficientes entre IgG4 contra CD20 humana (7D8) y los anticuerpos mutantes IgG1 e IgG4 contra EGFR (2F8) humanos indicados se determinó mediante un ELISA. El gráfico presentado muestra números promedio (n = 4). La reactividad biespecífica se presenta como la concentración de anticuerpos biespecíficos con respecto a la concentración de IgG total (porcentaje). La IgG4 humana con una bisagra estabilizada (CPPC) o mutación R409K en el dominio CH3 no es capaz de participar en el intercambio de brazos Fab. La IgG1 tanto con una secuencia

CPSC en la bisagra como con una mutación K409R en el dominio CH3 participa en el intercambio de brazos Fab. (*) La unión biespecífica para las mezclas que contienen IgG1-2F8, IgG4-2F8-CPPC o IgG4-2F8-R409K fue inferior al límite de detección y, por lo tanto, se fijó arbitrariamente en cero.

Figura 5: Generación de anticuerpos biespecíficos usando intercambio de brazos Fab inducido por 2-mercapto-etilamina·HCl (2-MEA) entre anticuerpos IgG1 e IgG4 humanos. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los anticuerpos contra EGFR (2F8) y CD20 (7D8) humanos indicados se determinó mediante un ELISA. Se sometió a ensayo una serie de concentraciones de 2-MEA 0-40 mM. La gráfica presentada muestra el resultado del ELISA en el que se usó una concentración de anticuerpos total de 20 µg/ml. La 2-MEA indujo eficientemente el intercambio de brazos Fab, también entre anticuerpos que contienen una bisagra estabilizada (CPPC). Con respecto a los dominios CH3, una combinación de IgG4 humana x IgG1 humana con la triple mutación T350I-K370T-F405L, dio como resultado niveles superiores de reactividad biespecífica en comparación con dos anticuerpos IgG4 de tipo silvestre.

Figura 6: Generación de anticuerpos biespecíficos usando intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre anticuerpos IgG1 e IgG4 humanos.

La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los anticuerpos contra EGFR (2F8) y CD20 (7D8) humanos indicados se determinó mediante espectrometría de masas para todas las muestras de la serie de concentraciones de 2-MEA 0-40 mM. (A) Se muestran ejemplos representativos de los perfiles de espectrometría de masas para muestras de reacciones de intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC con 2-MEA 0 mM, 7 mM y 40 mM. (B) Después de la cuantificación de los datos de espectrometría de masas, se calculó el porcentaje de anticuerpos biespecíficos y se representó frente a la concentración de 2-MEA en la reacción de intercambio de brazos Fab. IgG4-2F8 x IgG4-7D8 dio como resultado ~50 % de anticuerpo biespecífico. IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC dio como resultado ~95 % de anticuerpo biespecífico.

Figura 7: Análisis de estabilidad de anticuerpos biespecíficos heterodiméricos obtenidos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA. La estabilidad de las muestras biespecíficas generadas mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA mediante la combinación de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (A) o IgG4-2F8 x IgG4-7D8 (B) se sometió a ensayo midiendo la unión biespecífica de EGFR/CD20 en un ELISA después de una reacción de intercambio de brazos Fab inducida por GSH en presencia de las concentraciones indicadas de IgG4 irrelevante. La unión biespecífica se presenta con respecto a la unión biespecífica del material de partida (control), que se fijó en el 100 %. (A) La unión biespecífica del producto biespecífico inducido por 2-MEA derivado de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC se conservó, indicando un producto estable que no participó en el intercambio de brazos Fab en condiciones de GSH. (B) La unión EGFR/CD20 biespecífica del producto biespecífico inducido por 2-MEA derivado de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 se redujo, indicando que el producto participó en el intercambio de brazos Fab con el IgG4 irrelevante en condiciones de GSH.

Figura 8: Tasa de aclaramiento plasmático de un anticuerpo biespecífico heterodimérico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA. A tres grupos de ratones (3 ratones por grupo) se les inyectaron los anticuerpos indicados: (1) 100 µg de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC; (2) 100 µg de anticuerpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante; (3) 50 µg de IgG1-2F8-ITL + 50 µg de IgG4-7D8-CPPC. (A) Concentraciones de anticuerpos totales a lo largo del tiempo, determinadas mediante ELISA. Las curvas de las concentraciones plasmáticas de anticuerpos totales fueron las mismas para todos los anticuerpos. (B) Concentración de anticuerpos biespecíficos determinada mediante un ELISA. La biespecificidad del anticuerpo inyectado fue la misma con y sin la adición de un exceso de IgG4 irrelevante. (*) La unión biespecífica para la mezcla IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC fue inferior al límite de detección y, por lo tanto, en este gráfico no pudieron representarse los símbolos correspondientes. Se muestran los valores medios de dos experimentos ELISA.

Figura 9: Pureza del anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8 humana e IgG4-7D8-CPPC. (A) La SDS-PAGE reductora (a) muestra bandas de las cadenas pesadas y ligeras tanto para la muestra biespecífica como para la muestra de control de IgG1. SDS-PAGE no reductora (b). (B) Los resultados máximos del análisis por HP-SEC muestran que >98 % de la muestra biespecífica es homogénea y prácticamente no era detectable ningún agregado de anticuerpos. (C) La espectrometría de masas muestra que el intercambio de brazos Fab dio como resultado aproximadamente un 100 % de producto biespecífico.

Figura 10: Comparación entre mutante triple (ITL), mutantes dobles (IT, IL, TL) y mutante simple (L) de IgG1-2F8 humana en la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab con IgG4-7D8 humana. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes triples y dobles de IgG1-2F8 humana y la IgG4-7D8 de tipo silvestre con una bisagra de CPSC (A) o IgG4-7D8-CPPC mutante con una bisagra estabilizada (B), o el mutante simple IgG1-2F8-F405L e IgG4-7D8 con una bisagra de CPSC de tipo silvestre o de CPSC estabilizada (C), se determinó mediante un ELISA. Se analizó una serie de concentraciones (anticuerpos totales) de 0-20 µg/ml o 0-10 µg/ml en el ELISA para los experimentos que incluyeron los mutantes dobles y simples, respectivamente. Las combinaciones con los mutantes dobles IgG1-2F8-IL y -TL dan como resultado una unión EGFR/CD20 biespecífica similar a la del mutante triple IgG1-ITL. Las combinaciones con IgG1-2F8-IT no dan como resultado un producto biespecífico. Las combinaciones con el mutante simple IgG1-2F8-F405L dan como resultado una unión EGFR/CD20 biespecífica.

Figura 11: Generación de anticuerpos biespecíficos usando intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA a diferentes temperaturas. A la generación de anticuerpos biespecíficos mediante la combinación de los anticuerpos contra EGFR (2F8) y CD20 (7D8) humanos indicados en reacciones de intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA a 0 °C, 20 °C y 37 °C le siguió en el tiempo un ELISA. La unión biespecífica fue más eficiente a 37 °C y

más lenta a 20 °C. A 0 °C, no se midió generación de unión biespecífica.

Figura 12: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por diferentes agentes reductores. Se usó un ELISA para medir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante la combinación de IgG1-2F8-ITL humana e IgG4-7D8-CPPC en una reacción de reducción con series de concentraciones de los agentes reductores indicados. La unión biespecífica se midió después de las reacciones con DTT (máximo obtenido a DTT 2,5 mM) y 2-MEA (máximo obtenido a 2-MEA 25 mM), pero no con GSH. (*) Se excluyeron los datos de concentración de GSH >10 mM debido a la formación de agregados de anticuerpos.

Figura 13: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL y los mutantes IgG1-7D8-K409X indicados se determinó mediante un ELISA. (A) Se analizó una serie de concentraciones (anticuerpos totales) de 0-20 µg/ml. El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC. (B) El intercambio se presenta como unión biespecífica a 20 µg/ml con respecto al control positivo (barra de color negro). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre el control de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8), el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) y entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC. Las barras de color gris claro representan los resultados de reacciones de intercambio de brazos Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-7D8-K409X indicados e IgG1-2F8-ITL.

Figura 14: La desglicosilación de anticuerpos no afecta a la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los anticuerpos contra EGFR (2F8) y CD20 (7D8) indicados se determinó mediante un ELISA. El intercambio con los anticuerpos 7D8 se comparó con sus variantes desglicosiladas enzimáticamente. En el ELISA se analizó una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml. Las reacciones de intercambio de brazos Fab que implicaban anticuerpos desglicosilados (desglic) mostraron curvas de unión biespecíficas idénticas a las de las variantes glicosiladas de las que derivaban.

Figura 15: La capacidad para participar en el intercambio de brazos Fab se correlaciona con la fuerza de la interacción CH3-CH3. (A), (B) y (C) Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por GSH entre las construcciones IgG1-2F8 e IgG1-7D8 (A) o IgG4-2F8 e IgG4-7D8 (B y C) con las mutaciones indicadas, presentados como unión biespecífica en un ELISA a lo largo del tiempo. La biespecificidad se presenta con respecto al control de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 después de 24 h. (D) y (E) Relación entre la K_D aparente (Tabla 2) y la generación de anticuerpos biespecíficos después de 24 horas (Figuras 15A/B/C) para moléculas a base de IgG1 (D) o a base de IgG4 (E).

Figura 16: Alineación de secuencia del anticuerpo anti-EGFr 2F8 en una cadena principal de IgG1, IgG4 e IgG3 (parcial). Se representa la numeración de los aminoácidos de acuerdo con Kabat y el índice EU (ambos descritos en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Figura 17: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por diferentes agentes reductores. Se usó un ELISA para medir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante la combinación de IgG1-2F8-F405L humana e IgG1-7D8-K409R en una reacción de reducción con series de concentraciones de los agentes reductores indicados. Los valores de DO medidos se normalizaron a la señal de una muestra de control biespecífica derivada del intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, que se fijó en el 100 %. La unión biespecífica máxima se midió después de las reacciones con DTT en el intervalo de concentración de 0,5-50 mM, 2-MEA en el intervalo de concentración de 25-50 mM y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en el intervalo de concentración de 0,5-5,0 mM, pero no con GSH. (*) Se excluyeron los datos de concentración de GSH \geq 25 mM debido a la formación de agregados de anticuerpos.

Figura 18: Generación de anticuerpos biespecíficos usando intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas.

(A) La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA se determinó mediante un ELISA. La gráfica presentada muestra el resultado del ELISA en el que se usó una concentración de anticuerpos total de 20 µg/ml. 2-MEA indujo eficientemente el intercambio de brazos Fab. (B) La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA se determinó mediante espectrometría de masas para todas las muestras de la serie de concentraciones de 2-MEA 0-40 mM. Después de la cuantificación de los datos de espectrometría de masas, se calculó el porcentaje de anticuerpos biespecíficos y se representó frente a la concentración de 2-MEA en la reacción de intercambio de brazos Fab. IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R dio como resultado ~100 % de anticuerpo biespecífico, confirmando los datos de ELISA.

Figura 19: Pureza del anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humanas. La espectrometría de masas muestra que el intercambio de brazos Fab dio como resultado aproximadamente el 100 % de producto biespecífico.

Figura 20: Aclaramiento plasmático de un anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA. A dos grupos de ratones (3 ratones por grupo) se les inyectaron los anticuerpos indicados: (1) 100 µg de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R; (2) 100 µg de anticuerpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante. (A) Concentraciones de anticuerpos totales a lo largo del tiempo, determinadas mediante ELISA. Las curvas de las concentraciones plasmáticas de anticuerpos totales fueron las mismas para todos los anticuerpos. (B) Concentración de anticuerpos biespecíficos determinada mediante un ELISA. La biespecificidad del anticuerpo inyectado fue la misma con y sin la adición de un exceso de IgG4 irrelevante.

Figura 21: Destrucción celular mediada por CDC de células que expresan CD20 mediante un anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Se usaron series de concentraciones de los anticuerpos indicados para someter a ensayo su capacidad para mediar CDC en células Daudi (A) y Raji (B). Ambas estirpes celulares expresan CD20 pero no EGFR. La introducción de K409R en IgG1-7D8 no influyó en su capacidad para inducir CDC. El anticuerpo biespecífico derivado del intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R todavía fue capaz de inducir CDC.

Figura 22: Destrucción celular mediada por ADCC de células que expresan EGFR mediante un anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Se usaron series de concentraciones de los anticuerpos indicados para someter a ensayo su capacidad para mediar ADCC en células A431. IgG1-7D8 no puede unirse a las células A431 negativas para CD20 y, en consecuencia, no indujo ADCC. El anticuerpo contra EGFR IgG1-2F8 indujo ADCC, también después de la introducción de las mutaciones F405L en el dominio CH3. La función efectora de ADCC de IgG1-2F8-F405L se conservó en el formato biespecífico obtenido mediante intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

Figura 23: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-F405X indicados e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA. (A) En el ELISA se analizó una serie de concentraciones (anticuerpos totales) de 0-20 µg/ml. El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. (B) El intercambio se presenta como unión biespecífica a una concentración de anticuerpos de 20 µg/ml con respecto al control positivo (barra de color negro). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre el control de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras de color gris claro representan los resultados de reacciones de intercambio de brazos Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-F405X indicados e IgG1-7D8-K409R o controles.

Figura 24: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-Y407X indicados e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA. (A) En el ELISA se analizó una serie de concentraciones (anticuerpos totales) de 0-20 µg/ml. El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. (B) El intercambio se presenta como unión biespecífica a una concentración de anticuerpos de 20 µg/ml con respecto al control positivo (barra de color negro). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre el control de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras de color gris claro representan los resultados de reacciones de intercambio de brazos Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-Y407X indicados e IgG1-7D8-K409R o controles.

Figura 25: Análisis del anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Figura 25(A)) y reductoras (Figura 25(B)).

Figura 26: Perfiles de HP-SEC del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 26 (B)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 26 (A)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 26 (C)) y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 26 (D)).

Figura 27: Espectrometría de masas (EM-IEN) del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 27 (B)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 27 (A)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 27 (C)) y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 27 (D)).

Figura 28: Perfiles de isoelectroenfoque capilar (cIEF, por sus siglas en inglés) del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 28 (A)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 28 (B)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 28 (C)) y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 28 (D)).

Figura 29: Perfiles de HPLC-CIEC del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 29 (A)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 29 (B)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 29 (C)) y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 29 (D)).

Figura 30: Análisis por espectrometría de masas de ionización por electronebulización de IgG obtenida mediante cotransfección de los vectores de expresión que codifican la cadena pesada y ligera de IgG1-7D8-K409R o IgG1-2F8-F405. Los picos de heterodímero se indican con un *. Los picos de homodímero se indican con un †.

Figura 31: Reacción de intercambio de los homodímeros IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R controlada mediante cromatografía de líquidos de alta presión e intercambio catiónico (HPLC-CIEC, por sus siglas en inglés) después de la inyección a diferentes intervalos.

Figura 32: Homodímeros residuales de la reacción de intercambio como se muestra en la Figura 32, detectados con el método de CIEC (indicados por flechas).

Figura 33: Generación de anticuerpos biespecíficos a diversas concentraciones de IgG, concentraciones de 2-MEA, temperaturas de incubación y tiempos determinados mediante un ELISA.

Figura 34: Generación de anticuerpos biespecíficos a diversas concentraciones de IgG, concentraciones de 2-MEA, temperaturas y tiempos de incubación determinados mediante un ELISA y comparados con el control que se fijó arbitrariamente en el 100 %.

Figura 35: Generación de anticuerpos biespecíficos a diversas concentraciones de IgG, concentraciones de 2-MEA, temperaturas de incubación y tiempos analizada mediante HPLC-CIEEX.

Figura 36: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-L368X indicados e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA usando una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 37(A)). El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. La Figura 37(B) muestra la unión biespecífica a 20 µg/ml con respecto al control positivo (barra de color negro). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre el control de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras de color gris claro representan los resultados de reacciones de intercambio de brazos Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-L368X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 37: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-K370X indicados e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA usando una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 37(A)). El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. La Figura 37(B) muestra la unión biespecífica a 20 µg/ml con respecto al control positivo (barra de color negro). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre el control de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras de color gris claro representan los resultados de reacciones de intercambio de brazos Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-D370X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 38: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-D399X indicados e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA usando una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 38(A)). La Figura 38(B) muestra la unión biespecífica a una concentración de anticuerpo de 20 µg/ml con respecto al control positivo (barra de color negro). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre el control de IgG4 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras de color gris claro representan los resultados de reacciones de intercambio de brazos Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-D399X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 39: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre cuatro combinaciones de mutantes de IgG1 diferentes a 15 °C después de incubaciones de 0, 30, 60, 105 y 200 min determinado mediante ELISA sándwich.

Figura 40: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre combinaciones de mutantes de IgG1 diferentes después de la incubación de anticuerpos a 15 °C durante 90 min determinado mediante ELISA sándwich.

Figura 41: Fosforilación de c-Met por anticuerpos específicos de c-Met. Se incuban células A549 durante 15 minutos con HGF o un panel de anticuerpos diferentes. Las proteínas se separan mediante electroforesis en gel SDS-page y se transfieren a membranas mediante transferencia Western. Se detectan c-Met fosforilado, c-Met total y β-actina mediante anticuerpos contra c-Met fosforilado, c-Met total o β-actina.

Figura 42: Ensayo de proliferación con células NCI-H441. Se incubaron células NCI-H441 durante siete días con IgG1 biespecífica monovalente 069/b12, los anticuerpos de control (IgG1-069, UniBody-069, IgG1-b12) se dejaron sin tratar. Se determinó la masa celular y se representó gráficamente como porcentaje de muestras no tratadas (establecido como 100 %).

Figura 43: Destrucción celular mediada por CDC de células que expresan CD20 mediante anticuerpos biespecíficos generados mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L o IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R. Se usaron series de concentraciones de los anticuerpos indicados para someter a ensayo su capacidad para mediar CDC en células Daudi (A) y Raji (B). Ambas estirpes celulares expresan CD20 pero no EGFR. El anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R fue tan eficaz como IgG1-7D8 en la inducción de la destrucción celular mediada por CDC. El anticuerpo biespecífico derivado del intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R da como resultado un anticuerpo biespecífico de unión a CD20 monovalente, lo que afectó levemente a la inducción de la destrucción celular mediada por CDC.

Figura 44: Destrucción de células A431 inducida por anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 preincubados anti-ETA'-kappa. La viabilidad de las células A431 después de 3 días de incubación con anticuerpos contra HER2, preincubados con anti-kappa-ETA'. La viabilidad celular se cuantificó usando Alamarblue. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia (IF) de un experimento con células A431 tratadas con anticuerpos contra HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' y anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2. Se usó estaurosporina como control positivo, mientras que se usó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo.

Figura 45: Las moléculas biespecíficas de HER2 x HER2 indujeron la modulación negativa del receptor HER2. Porcentaje relativo de los niveles de expresión de HER2 en lisados de células AU565 después de 3 días de incubación con mAb 10 µg/ml. La cantidad de HER2 se cuantificó usando un ELISA de captura específico de HER2 y se representó como porcentaje de inhibición en comparación con las células sin tratar. Los datos mostrados son la media de dos experimentos más la desviación típica.

Figura 46: Análisis de localización de anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 (FITC) con el marcador lisosómico LAMP1 (Cy5). Intensidad de píxeles de FITC superpuesta con Cy5 para diversos anticuerpos contra HER2 monoespecíficos y anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 (Figura 46 (B)) Se representa la intensidad de píxeles de FITC en píxeles positivos para LAMP1/Cy5 de tres imágenes diferentes para cada anticuerpo analizado. Los monoespecíficos muestran intensidades de píxeles de FITC inferiores en los píxeles positivos para LAMP1/Cy5 en comparación con los biespecíficos. La Figura 46 (B) representa el valor medio de la intensidad de píxeles de FITC por píxel positivo para LAMP1/Cy5 calculado a partir de las tres imágenes diferentes. En conjunto, estos resultados indican que después de la internalización, niveles superiores de anticuerpos biespecíficos, en comparación con anticuerpos monoespecíficos, se localizan en vesículas positivas para Lamp1/Cy5.

Figura 47: Inhibición de la proliferación por anticuerpos mono y biespecíficos de HER-2. Se sembraron células AU565 en presencia de anticuerpo contra HER2 o anticuerpo biespecífico de HER2 x HER2 10 µg/ml en medio de cultivo celular sin suero. Después de tres días, la cantidad de células viables se cuantificó con Alamarblue y la viabilidad celular se presentó como un porcentaje con respecto a las células sin tratar. Se usó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo. Los datos mostrados son el porcentaje de células AU565 viables en comparación con las células sin tratar, medido en cinco veces \pm la desviación típica. * indica que solo se representó un punto de datos.

Figura 48: Unión de anticuerpos IgG1 mono y biespecíficos e IgG1 con bisagra suprimida a FcRn humano y de ratón a diferentes pH. Se incubaron placas con FcRn humano y de ratón con diferentes anticuerpos IgG1 mono y biespecíficos o moléculas de IgG1 con bisagra suprimida. La unión a FcRn se analizó mediante ELISA a 405 nm. **(A)** Unión de anticuerpos IgG1 mono y biespecíficos y moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1) a FcRn humano a pH 7,4 y 6,0. La unión a FcRn humano es muy baja a pH neutro. A pH 6,0, los anticuerpos (biespecíficos) se unen eficazmente al FcRn humano, a menos que contengan la mutación H435A. Las moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1) se unen al FcRn humano con baja eficiencia. **(B)** Unión de anticuerpos IgG1 mono y biespecíficos y moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1) a FcRn de ratón a pH 7,4 y 6,0. La unión a FcRn de ratón es muy baja a pH neutro. A pH 6,0, los anticuerpos (biespecíficos) se unen muy eficientemente a FcRn de ratón, a menos que contengan la mutación H435A en ambos brazos Fab. La molécula biespecífica que alberga la mutación H435A en un solo brazo Fab todavía puede unirse a FcRn de ratón. Las moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1) se unen a FcRn de ratón con una eficiencia intermedia y la molécula biespecífica de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1) que alberga la mutación H435A solo en el brazo Fab es ligeramente menos eficiente.

Figura 49: Citotoxicidad mediada por linfocitos T de células AU565 mediante anticuerpos biespecíficos de Her2 x CD3, así como mediante mutantes N297Q de anticuerpos biespecíficos de Her2 x CD3.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado bien. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2.^a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada comprende normalmente una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada normalmente comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Las cadenas pesadas están interconectadas a través de enlaces disulfuro en la denominada "región bisagra". Cada cadena ligera normalmente comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera normalmente comprende un dominio, CL. Normalmente, la numeración de los restos de aminoácidos en la región constante se realiza de acuerdo con el índice EU descrito en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). La Figura 16 proporciona una visión de conjunto de la numeración UE y de Kabat para diferentes formas de isotipo del anticuerpo 2F8 (documento WO 02/100348). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL comprende normalmente tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196, 901 917 (1987)).

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "brazo Fab" se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "región Fc" se refiere a una región de anticuerpo que comprende al menos la región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

El término "anticuerpo" (Ab, por sus siglas en inglés) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 min, al menos aproximadamente 45 min, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas (h), aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada a la unión del anticuerpo al antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del

complemento tales como C1q, el primer componente de la vía clásica de activación del complemento. Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar. La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos epítopos diferentes, epítopos normalmente no superpuestos. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos que se indique otra cosa o que el contexto lo contradiga claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente al antígeno. Dichos fragmentos pueden proporcionarse mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas de expresión recombinante. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un fragmento F(ab')₂. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se indique otra cosa, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

La expresión "anticuerpo de longitud completa", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera que normalmente se encuentran en un anticuerpo de ese isotipo.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de cadena pesada.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias armazón humanas.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo de cadena pesada" o "anticuerpo de cadena pesada" se refiere a un anticuerpo que consiste sólo en dos cadenas pesadas y carece de las dos cadenas ligeras que por lo general se encuentran en los anticuerpos. Los anticuerpos de cadena pesada, que se encuentran de forma natural, por ejemplo, en los camélidos, pueden unirse a antígenos a pesar de tener sólo dominios VH.

El término "epítipo" significa una proteína determinante capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos por lo general consisten en agrupaciones de moléculas de superficie tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen por que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que son bloqueados eficazmente por el péptido de unión a antígeno específicamente (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente).

Como se usa en el presente documento, el término "unión" la expresión "se une específicamente" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado normalmente es una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, por ejemplo, 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos, o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIAcore 3000 que usa el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces inferior, tal como al menos 100 veces inferior, por ejemplo, al menos 1.000 veces inferior, tal como al menos 10.000 veces inferior, por ejemplo, al menos 100.000 veces inferior que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es inferior depende de la K_D del anticuerpo, de manera que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es inferior a la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. El término " K_D " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "interacción heterodimérica entre la regiones CH3 primera y segunda" se refiere a la interacción entre la primera región CH3 y la segunda región CH3 en una proteína heterodimérica primera-CH3/segunda-CH3.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "interacciones homodiméricas de la regiones CH3 primera y segunda" se refiere a la interacción entre una primera región CH3 y otra primera región CH3 en una proteína homodimérica primera-CH3/primer-CH3 y la interacción entre una segunda región CH3 y otra segunda región CH3

en una proteína homodimérica segunda-CH3/segunda-CH3.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, indica que el material se ha eliminado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de forma natural o la célula hospedadora si se expresa de forma recombinante). También es ventajoso que los anticuerpos estén en forma purificada. El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se prevé como una definición relativa, que indica un aumento de la concentración de anticuerpos con respecto a la concentración de contaminantes en una composición en comparación con el material de partida.

La expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK293, células NS/O y células linfocíticas.

Cuando se usa en el presente documento, el término "coexpresión" de dos o más construcciones de ácido nucleico, se refiere a la expresión de las dos construcciones en una única célula hospedadora.

La expresión "proteína de célula tumoral" se refiere a una proteína ubicada en la superficie celular de una célula tumoral.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que participa en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias de ejemplo incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como linfocitos B y linfocitos T, incluyendo linfocitos T citolíticos (CTL, por sus siglas en inglés)), linfocitos citolíticos, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y realizan funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), tal como un linfocito citolítico natural, capaz de inducir ADCC. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana.

La expresión "condiciones reductoras" o "entorno reductor" se refiere a unas condiciones o a un entorno en el que un sustrato, en el presente documento un resto cisteína en la región bisagra de un anticuerpo, tiene más probabilidades de reducirse que de oxidarse.

La expresión "isomerización de enlaces disulfuro" se refiere a un intercambio de enlaces disulfuro entre diferentes cisteínas, es decir, la redistribución de los enlaces disulfuro.

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención

Como se ha descrito anteriormente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para generar un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) proporcionar un primer anticuerpo monoespecífico homodimérico que comprende una región Fc de inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3, en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central

b) proporcionar una segunda proteína homodimérica que comprende una región Fc de inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3, en donde dicho segundo anticuerpo monoespecífico comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico se une a un primer epítipo y dichos segundos anticuerpos monoespecíficos se unen a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes,

c) incubar dicho primer anticuerpo monoespecífico junto con dicho segundo anticuerpo monoespecífico en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las secuencias Cys-Pro-Pro-Cys de la región bisagra central experimenten isomerización de enlaces disulfuro, y

d) obtener dicho anticuerpo biespecífico.

El formato biespecífico puede usarse de muchas maneras para generar combinaciones deseadas de anticuerpos

biespecíficos. Además de ser capaz de combinar anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos de una manera muy selectiva, puede usarse para cambiar una propiedad deseada, por ejemplo, para aumentar la CDC, mediante la combinación de dos anticuerpos diferentes dirigidos al mismo antígeno. Además, puede usarse para eliminar la actividad agonista parcial de un anticuerpo antagonista o convertir un anticuerpo agonista en un anticuerpo antagonista mediante la fabricación de un anticuerpo biespecífico del mismo con un anticuerpo irrelevante (inactivo).

En algunas realizaciones, dicho primer y/o segundo anticuerpo monoespecífico comprende, además de la región Fc, una o más o todas las demás regiones de un anticuerpo, es decir, una región CH1, una región VH, una región CL y/o una región VL. Por lo tanto, en una realización, dicho primer anticuerpo monoespecífico es un anticuerpo de longitud completa. En otra realización, dicho segundo anticuerpo monoespecífico es un anticuerpo de longitud completa.

En una realización importante, dichos anticuerpos monoespecíficos primero y segundo son preferentemente anticuerpos de longitud completa y se unen a diferentes epítomos. Dichos epítomos pueden ubicarse en diferentes antígenos o en el mismo antígeno.

En otras realizaciones, sin embargo, sólo uno de los anticuerpos monoespecíficos es un anticuerpo de longitud completa y el otro anticuerpo monoespecífico no es un anticuerpo de longitud completa. En una realización adicional, ninguno de los anticuerpos monoespecíficos es un anticuerpo de longitud completa.

En una realización, la región Fc del primer anticuerpo monoespecífico es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y la región Fc del segundo anticuerpo monoespecífico es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. En una realización preferida, las regiones Fc de ambos de tanto dicho primer como dicho segundo anticuerpo monoespecífico son del isotipo IgG1. En otra realización preferida, una de las regiones Fc de dichos anticuerpos monoespecíficos es del isotipo IgG1 y la otra del isotipo IgG4. En la última realización, el anticuerpo biespecífico resultante comprende una región Fc de una IgG1 y una región Fc de una IgG4 y, por lo tanto, puede tener propiedades intermedias interesantes con respecto a la activación de funciones efectoras. Puede obtenerse un producto similar si dicho primer y/o segundo anticuerpo monoespecífico comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn o se manipula de otro modo para cambiar las propiedades de glicosilación.

En una realización adicional, uno o ambos de los anticuerpos monoespecíficos se modifican mediante ingeniería de glicosilación para reducir la fucosa y, por lo tanto, potenciar la ADCC, por ejemplo, mediante la adición de compuestos a los medios de cultivo durante la producción de anticuerpos como se describe en el documento US2009317869 o como se describe en van Berkel *et al.* (2010) *Biotechnol. Bioeng.* 105:350 o mediante el uso de células con inactivación de FUT8, por ejemplo, como se describe en Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614. La ADCC puede optimizarse como alternativa usando el método descrito por Umaña *et al.* (1999) *Nature Biotech.* 17:176.

En una realización adicional, uno o ambos anticuerpos monoespecíficos se han modificado mediante ingeniería genética para potenciar la activación del complemento, por ejemplo, como se describe en Natsume *et al.* (2009) *Cancer Sci.* 100:2411.

En una realización adicional, uno o ambos anticuerpos monoespecíficos se han modificado por ingeniería genética para reducir o aumentar la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn) con el fin de manipular la semivida sérica de la proteína heterodimérica.

En una realización adicional, uno de los anticuerpos de partida monoespecíficos se ha modificado por ingeniería genética para no unirse a la Proteína A, permitiendo de este modo separar el anticuerpo biespecífico de dichos anticuerpos de partida homodiméricos haciendo pasar el producto sobre una columna de proteína A. En particular, esto puede ser útil para realizaciones en donde se usa un exceso de un anticuerpo monoespecífico con respecto al otro anticuerpo monoespecífico como material de partida. En dichas realizaciones, puede ser útil modificar por ingeniería genética el anticuerpo monoespecífico que está en exceso para que pierda su capacidad para unirse a la proteína A. Después de la reacción de heterodimerización, la proteína heterodimérica puede entonces separarse de un excedente de proteína homodimérica sin intercambiar mediante el paso sobre una columna de proteína A.

En una realización adicional, uno de los anticuerpos homodiméricos es un anticuerpo o un anticuerpo de longitud completa que reconoce un epítipo no relevante o un anticuerpo de longitud completa que contiene secuencias derivadas de la estirpe germinal que no han experimentado hipermutación somática y no se unen a autoantígenos. En una realización de este tipo, el anticuerpo biespecífico actúa como un anticuerpo monovalente. En otra realización, ambas proteínas homodiméricas comprenden la misma cadena pesada, pero sólo una de las proteínas homodiméricas contiene una cadena ligera que forma un sitio de unión a antígeno funcional con dicha cadena pesada, mientras que la otra proteína homodimérica contiene una cadena ligera no funcional, que no se une a ningún antígeno en combinación con dicha cadena pesada. En una realización de este tipo, la proteína heterodimérica actúa como un anticuerpo monovalente. Una cadena ligera no funcional de este tipo puede ser, por ejemplo, una secuencia derivada de la estirpe germinal que no ha experimentado hipermutación somática y no se une a autoantígenos.

Los anticuerpos que han de usarse como material de partida homodimérico de la presente invención pueden

producirse, por ejemplo, mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624 628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222, 581 597 (1991). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos de murino obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados tales como ratas, perros, primates, etc.

Los anticuerpos que han de usarse como material de partida homodimérico de la presente invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados. En otra realización, una o ambas de las proteínas de partida homodiméricas, excepto por cualquier mutación especificada, es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos, por ejemplo, ratones HuMAb, que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. El ratón HuMAb contiene un minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifica las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera κ humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus endógenos de cadena μ y κ (Lonberg, N. *et al.*, *Nature* 368, 856 859 (1994)). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos, experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad IgG κ (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol. Vol.* 13 65 93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764 536 546 (1995)). La preparación de los ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor, L. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. *et al.*, *International Immunology* 5, 647 656 (1993), Tuailon *et al.*, *J. Immunol.* 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. *et al.*, *International Immunology* 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845 851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187. Los esplénocitos de estos ratones transgénicos pueden usarse para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

Además, los anticuerpos humanos de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención de otras especies pueden identificarse a través de tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación en retrovirus, presentación en ribosomas, presentación en mamíferos y otras técnicas, usando técnicas conocidas en la materia, y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la materia.

En una realización adicional de la invención, el anticuerpo o una parte del mismo, por ejemplo, una o más CDR, es de una especie de la familia *Camelidae*, véase el documento WO2010001251, o una especie de pez cartilaginoso, tal como el tiburón nodriza o los anticuerpos de cadena pesada o de dominio.

En una realización del método de la invención, dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo proporcionados en la etapa a) y b) se purifican.

En una realización, el primer y/o segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico se conjuga con un fármaco, un profármaco o una toxina o contiene un grupo aceptor para el mismo. Dicho grupo aceptor puede ser, por ejemplo, un aminoácido no natural.

Como se ha descrito anteriormente, las secuencias de las regiones CH3 primera y segunda de los anticuerpos monoespecíficos de partida homodiméricos son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda.

En una realización, la fuerza aumentada de la interacción heterodimérica en comparación con cada una de las interacciones homodiméricas se debe a modificaciones de CH3 distintas de la introducción de enlaces covalentes, restos cisteína o restos con carga.

En algunas realizaciones, el producto de la invención es altamente estable y no experimenta intercambio de brazos Fab en condiciones ligeramente reductoras *in vitro* o, de manera importante, *in vivo* tras su administración a un ser humano. Por lo tanto, en una realización, la interacción heterodimérica entre dichos anticuerpos primero y segundo en el anticuerpo heterodimérico resultante es de manera que no puede producirse ningún intercambio de brazos Fab a GSH 0,5 mM en las condiciones descritas en el Ejemplo 13.

En otra realización, la interacción heterodimérica entre dichos anticuerpos primero y segundo en el anticuerpo heterodimérico resultante es de manera que no se produce ningún intercambio de brazos Fab *in vivo* en ratones en

las condiciones descritas en el Ejemplo 14.

En otra realización, la interacción heterodimérica entre dichos anticuerpos primero y segundo en el anticuerpo heterodimérico resultante es más de dos veces más fuerte, tal como más de tres veces más fuerte, por ejemplo, más de cinco veces más fuerte que la más fuerte de las dos interacciones homodiméricas, por ejemplo, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 30.

En una realización adicional, las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son de manera que las constantes de disociación de la interacción heterodimérica entre dicho anticuerpos primero y segundo en el anticuerpo heterodimérico resultante son inferiores a 0,05 micromolar cuando se someten a ensayo como se describe en el Ejemplo 30.

En una realización adicional, las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son de manera que las constantes de disociación de ambas interacciones homodiméricas son superiores a 0,01 micromolar, tal como, superiores a 0,05 micromolar, preferentemente entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, incluso más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 cuando se someten a ensayo como se describe en el Ejemplo 21. Las realizaciones en donde los anticuerpos de partida homodiméricos son relativamente estables pueden tener la ventaja de que es más fácil producir una gran cantidad de anticuerpo de partida y, por ejemplo, evitar la agregación o el plegamiento erróneo.

En algunas realizaciones, un anticuerpo heterodimérico estable puede obtenerse con un alto rendimiento usando el método de la invención sobre la base de dos anticuerpos de partida homodiméricos que contienen sólo unas pocas mutaciones asimétricas, bastante conservadoras, en las regiones CH3.

Por lo tanto, en una realización, las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda contienen sustituciones de aminoácidos en posiciones no idénticas.

En una realización, los aminoácidos son aminoácidos naturales.

En una realización, dicha primera proteína homodimérica no tiene más de una sustitución de aminoácido en la región CH3 y la segunda proteína homodimérica no tiene más de una sustitución de aminoácido en la región CH3 con respecto a las regiones CH3 de tipo silvestre.

En una realización, el primer anticuerpo monoespecífico homodimérico tiene una sustitución de aminoácido en la posición 405 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 409.

En una realización, el primer anticuerpo monoespecífico homodimérico tiene una sustitución de aminoácido en la posición 409 y dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico tiene una sustitución de aminoácido en la posición 405.

En consecuencia, en una realización, las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda contienen mutaciones asimétricas, es decir, mutaciones en diferentes posiciones en las dos regiones CH3, por ejemplo, una mutación en la posición 405 en una de las regiones CH3 y una mutación en la posición 409 en la otra región CH3.

En otra realización, dicho primer anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409, y dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

En una realización adicional, dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

Incluso en una realización adicional, dicho primer anticuerpo monoespecífico comprende una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409, y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización, dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización, dicho primer anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409, y dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización, dicho primer anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Thr en la posición 350,

una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409, y dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

- 5 Además de las sustituciones de aminoácidos especificadas anteriormente, dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo pueden contener sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a las secuencias de Fc de tipo silvestre.

- 10 En una realización adicional, dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 (IgG1m (a)):

SEQ ID NO: 1:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 15 En una realización adicional, dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 (IgG1m (f)):

SEQ ID NO: 2:

GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 20 En una realización adicional, dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 (IgG1m (ax)):

SEQ ID NO: 3:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

- 30 La secuencia de la región bisagra de los anticuerpos de partida homodiméricos puede variar. Sin embargo, el anticuerpo biespecífico resultante puede ser más estable en algunas circunstancias si la región bisagra no es similar a IgG4 y, preferentemente, es similar a IgG1.

- Por lo tanto, ambos de dicho primer y dicho segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprenden una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra (central).

- 35 En muchas realizaciones, dichos anticuerpos comprenden además una cadena ligera. Como se ha explicado anteriormente, dichas cadenas ligeras pueden ser diferentes, es decir, difieren en la secuencia y cada una forma un dominio de unión a antígeno funcional con sólo una de las cadenas pesadas. En otra realización, sin embargo, dichos anticuerpos homodiméricos primero y segundo son anticuerpos de cadena pesada, que no necesitan una cadena ligera para la unión a antígeno, véase, por ejemplo, Hamers-Casterman (1993) *Nature* 363:446.

- 40 Como se ha descrito anteriormente, la etapa c) del método de la invención comprende incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlace disulfuro. En el presente documento se proporcionan ejemplos de condiciones adecuadas. Los requisitos mínimos para que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlace disulfuro pueden diferir dependiendo de los anticuerpos de partida homodiméricos, en particular dependiendo de la secuencia exacta en la región bisagra. Es importante que las interacciones homodiméricas respectivas de dichas regiones CH3 primera y segunda sean suficientemente débiles para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlace disulfuro en las condiciones dadas.

- 50 En una realización, las condiciones reductoras en la etapa c) comprenden la adición de un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditiotreitól (DTT), ditiotritól (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina.

- 55 En una realización, las condiciones reductoras que permiten el intercambio de brazos Fab controlado se describen en términos del potencial redox requerido. El tripéptido glutatión (GSH) es el principal tiol de bajo peso molecular en las células y controla el estado redox del tiol-disulfuro, que es esencial para la señalización redox normal *in vivo*. La dinámica del equilibrio redox celular se consigue mediante el mantenimiento del estado de tiol-a-disulfuro del GSH reducido y su forma oxidada GSSG. Los valores para el potencial de reducción pueden medirse como en Rost y Rapoport, *Nature* 201: 185 (1964) y Aslund *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:30780-30786 (1997). El potencial redox E_h , que

tiene en cuenta la estequiometría de dos GSH oxidados por cada GSSG es una medida cuantitativa del estado redox. E_h se calcula mediante la ecuación de Nernst: $E_h = E_o + (RT/nF) \ln ([GSSG (ox)]/[GSH (red)]^2)$. E_o es el potencial patrón para el par redox a un pH definido, R es la constante de gas, T es la temperatura absoluta, F es la constante de Faraday y n es el número de electrones transferidos. Las estimaciones *in vivo* de E_h para el par GSH/GSSG están en el intervalo de -260 a -200 mV (Aw, T., *News Physiol. Sci.* 18:201-204 (2003)). Las células diferenciadas terminalmente mantienen de este modo un E_h del orden de -200 mV, mientras que las células que proliferan activamente mantienen un E_h más reducido de aproximadamente -260 mV.

El potencial redox patrón para DTT es -330 mV (Cleland *et al. Biochemistry* 3: 480-482 (1964)). Se ha demostrado que TCEP reduce DTT en solución y, por lo tanto, tiene un potencial redox más negativo que DTT. Sin embargo, no se ha informado del valor exacto. Por lo tanto, las condiciones reductoras que permiten condiciones de intercambio de brazos Fab controladas pueden describirse en términos de un potencial redox E_h requerido, que está óptimamente por debajo del valor que se alcanza en condiciones plasmáticas normales *in vivo* y que está por encima del potencial redox que reduce los enlaces disulfuro de anticuerpos fuera de los ubicados en la región bisagra e implicados en la formación de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas.

Por lo tanto, en una realización adicional, la etapa c) se realiza en condiciones reductoras con un potencial redox que varía por debajo de -50 mV, tal como por debajo de -150 mV, preferentemente entre -150 y -600 mV, tal como entre -200 y -500 mV, más preferentemente entre -250 y -450 mV, tal como entre -250 y -400 mV, incluso más preferentemente entre -260 y -300 mV.

En una realización adicional, la etapa c) comprende la incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de 2-mercaptoetilamina al menos 25 mM o en presencia de ditiotreitól al menos 0,5 mM. La incubación puede realizarse a un pH de 5 a 8, tal como a pH 7,0 o a pH 7,4.

En una realización adicional, la etapa d) comprende restablecer las condiciones para que se vuelvan no reductoras o menos reductoras, por ejemplo mediante la eliminación de un agente reductor, por ejemplo, mediante desalación.

En algunas realizaciones, el método de la invención produce un producto de anticuerpo en donde más del 80 %, tal como más del 90 %, por ejemplo, más del 95 %, tal como más del 99 % de las moléculas de anticuerpo son los anticuerpos biespecíficos deseados.

La postproducción es más flexible y más fácil de controlar en comparación con los métodos anteriores basándose en la coexpresión.

La naturaleza de postproducción de la fabricación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de Fab en condiciones reductoras (tal como mediante la adición de 2-MEA) como se divulga en el presente documento la convierte en una estrategia muy adecuada para el cribado (de alto rendimiento) de múltiples combinaciones de especificidades para el descubrimiento de anticuerpos biespecíficos. Además, el proceso *in vitro* puede realizarse en el laboratorio lo que permite mayor control, flexibilidad y rendimiento del anticuerpo biespecífico que los que permite la coexpresión. Una ventaja adicional de esta estrategia es que el cribado puede realizarse en el formato terapéutico final, lo que elimina la necesidad de ingeniería tras la selección de candidatos.

Como se ha explicado anteriormente, en un aspecto adicional, el método de la invención puede usarse para el cribado "matricial", es decir, para generar un gran número de combinaciones diferentes de especificidades de unión sobre la base de dos conjuntos de anticuerpos, un conjunto que tiene primeras regiones CH3 idénticas y el otro conjunto que tiene segundas regiones CH3 idénticas, en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda.

En una realización, la invención se refiere a un método para la selección de un anticuerpo biespecífico que tiene una propiedad deseada, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) proporcionar un primer conjunto de anticuerpos homodiméricos que comprende anticuerpos con regiones variables diferentes y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, en donde dichos anticuerpos de dicho primer conjunto comprenden primeras regiones CH3 idénticas, en donde dichas regiones CH3 comprenden una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU),

b) proporcionar un segundo conjunto de anticuerpos homodiméricos que comprende anticuerpos con regiones variables diferentes o regiones variables idénticas y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, en donde dichos anticuerpos de dicho segundo conjunto comprenden segundas regiones CH3 idénticas, en donde dichas regiones CH3 comprenden una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU),

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, en donde dichos anticuerpos homodiméricos primero y

segundo se unen a diferentes epítomos,

c) incubar combinaciones de anticuerpos de dicho primer conjunto y de dicho segundo conjunto en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlace disulfuro, generando de este modo un conjunto de anticuerpos biespecíficos,

d) restablecer opcionalmente las condiciones a no reductoras,

e) someter a ensayo el conjunto resultante de anticuerpos biespecíficos para una propiedad deseada dada, y

f) seleccionar un anticuerpo biespecífico que tenga la propiedad deseada.

En una realización, los anticuerpos homodiméricos del segundo conjunto tienen regiones variables diferentes.

En una realización, los anticuerpos homodiméricos del segundo conjunto tienen regiones variables idénticas, pero tienen diferentes aminoácidos o variaciones estructurales fuera de la región de unión a antígeno.

Los dos conjuntos pueden componerse de muchas maneras diferentes según se desee. Por lo tanto, los dos conjuntos pueden dirigirse a diferentes epítomos en el mismo antígeno. Los dos conjuntos también pueden dirigirse a diferentes antígenos, y cada conjunto puede contener anticuerpos que se unan al mismo epítipo o a diferentes epítomos en el antígeno en cuestión. Además, uno de los conjuntos o ambos conjuntos pueden contener cada uno anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos.

En otra realización, dicha propiedad deseada es la destrucción celular, la lisis celular, la inhibición de la proliferación celular o la unión a células que expresan ambas dianas antigénicas.

La estrategia de detección incluye dos paneles de vectores de anticuerpos que contienen una gama de especificidades, donde un panel se clona en una estructura principal que es capaz de participar en un intercambio de brazos Fab en condiciones reductoras (tal como mediante la adición de 2-MEA) con la estructura principal del segundo panel. Por ejemplo, el primer panel se clona en una cadena principal de IgG1-F405L y el segundo panel se clona en una cadena principal de IgG1-K409R (para otras posibles combinaciones de cadenas principales, véanse también los Ejemplos 19, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 38 y 39).

Después, cada miembro de los dos paneles de vectores de anticuerpos se expresa individualmente a pequeña escala. Por ejemplo, todos los vectores de anticuerpos se transfectan transitoriamente en células HEK293 y se expresan en cultivos de 2,3 ml en placas de 24 pocillos. Como alternativa, pueden usarse otros sistemas de producción adecuados (a pequeña escala) conocidos en la técnica.

Después, los anticuerpos expresados de los dos paneles de anticuerpos se mezclan por pares, en forma de matriz, a relaciones equimolares. Por ejemplo, todos los anticuerpos individuales se purifican mediante cromatografía de proteína A a pequeña escala y la concentración de anticuerpos se mide por absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Como alternativa, pueden usarse otros métodos de purificación adecuados (a pequeña escala) o métodos para determinar la concentración de proteínas conocidos en la técnica. En otra realización, la etapa de purificación puede omitirse si las aplicaciones corriente abajo no se ven afectadas por el medio de expresión. Posteriormente, las concentraciones de anticuerpos se normalizan para que un volumen adecuado contenga cantidades equimolares de ambos anticuerpos. Por ejemplo, un panel de 8 anticuerpos en la cadena principal de F405L se mezcla individualmente con 8 anticuerpos en la cadena principal de K409R de manera que 64 mezclas de 100 µl contienen 80 µg/ml de anticuerpo A (F405L) y 80 µg/ml de anticuerpo B (K409R). Como alternativa, si la estrategia contiene una etapa de purificación específica de anticuerpo biespecífico corriente abajo, es posible que se omita la etapa para normalizar las cantidades de anticuerpos.

A las mezclas de anticuerpos, se les añade una cantidad adecuada de agente reductor y la mezcla se incuba durante un período de tiempo adecuado a una temperatura permisiva. Por ejemplo, a 100 µl que contienen 80 µg/ml de anticuerpo A (F405L) y 80 µg/ml de anticuerpo B (K409R), se les añaden 25 µl de 2-MEA 125 mM (concentración final 25 mM de 2-MEA) y la mezcla se incuba durante la noche a 25 °C.

Posteriormente el agente reductor se elimina de las mezclas (que ahora contienen anticuerpos biespecíficos) para promover la oxidación de los enlaces disulfuro y evitar la interferencia del agente reductor en los ensayos de cribado. Por ejemplo, 2-MEA se elimina realizando un intercambio de tampones de las 64 mezclas usando placas de desalación Zeba Spin de 96 pocillos (Pierce Biotechnology, N.º 89807). Como alternativa, pueden usarse otros métodos adecuados para eliminar el agente reductor conocidos en la técnica.

Después, los anticuerpos biespecíficos se caracterizan bioquímicamente o funcionalmente para identificar a los candidatos principales. Por ejemplo, se evalúan los 64 anticuerpos biespecíficos para determinar la inhibición de la proliferación de estirpes celulares adecuadas o la unión a estirpes celulares adecuadas. Los candidatos principales identificados se producirán después a mayor escala y se caracterizarán con más detalle.

Producción mediante coexpresión

Los anticuerpos biespecíficos de la invención también pueden obtenerse mediante la coexpresión de construcciones que codifican un primer y un segundo polipéptido que comprenden una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo en una célula individual.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir una proteína heterodimérica, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) proporcionar una primera construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una primera cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo que comprende una primera región CH3 que comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 (numeración EU) y que comprende además una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,

b) proporcionar una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una segunda cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo que comprende una primera región CH3 que comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU) y que comprende además una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dicha primera cadena pesada de longitud completa se une a un primer epítipo y dicha segunda cadena pesada de longitud completa se une a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes,

c) coexpresar dichas construcciones de ácido nucleico primera y segunda en una célula hospedadora, y

d) obtener dicha proteína heterodimérica a partir del cultivo celular.

Los vectores de expresión adecuados, incluyendo promotores, potenciadores, etc., y las células hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen levadura, células bacterianas y de mamíferos, tales como células CHO o HEK.

En una realización de este método,

las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son de manera que las constantes de disociación de las interacciones homodiméricas de cada una de las regiones CH3 están entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, incluso más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 cuando se someten a ensayo como se describe en el Ejemplo 21.

Dichas cadenas pesadas de longitud completa primera y segunda se unen a diferentes epítipos (es decir, dichas construcciones de ácido nucleico primera y segunda codifican cadenas pesadas de longitud completa de dos anticuerpos que se unen a diferentes epítipos) y, por lo tanto, la proteína heterodimérica es un anticuerpo biespecífico. Este anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo de cadena pesada, o dicha célula hospedadora puede expresar además una o más construcciones de ácido nucleico que codifican una cadena ligera. Si sólo se coexpresa una construcción de cadena ligera con las construcciones de cadena pesada, entonces, un anticuerpo biespecífico funcional sólo se forma si la secuencia de la cadena ligera es de manera que puede formar un dominio de unión a antígeno funcional con cada una de las cadenas pesadas. Si dos o más construcciones de cadena ligera diferentes se coexpresan con la cadena pesada, se formarán múltiples productos.

En realizaciones adicionales, el método de coexpresión de acuerdo con la invención comprende cualquiera de las características adicionales descritas en el método *in vitro* anterior.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende las construcciones de ácido nucleico primera y segunda especificadas anteriormente en el presente documento. Incluso en un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende las construcciones de ácido nucleico primera y segunda especificadas anteriormente en el presente documento.

Anticuerpos biespecíficos

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico obtenido u obtenible mediante el método de la invención.

Además, el método de la invención permite la formación de moléculas de anticuerpo asimétricas, moléculas con

características diferentes en cada uno de los brazos Fab o en cada uno de los dominios CH3 o moléculas con modificaciones distintas en todas las moléculas, por ejemplo, moléculas con una o más sustituciones de aminoácidos no naturales para la conjugación. Estas moléculas de anticuerpo asimétricas pueden generarse en cualquier combinación adecuada. Esto se ilustra adicionalmente a continuación con algunos ejemplos no limitantes.

5 Los anticuerpos biespecíficos pueden usarse para el predireccionamiento a una célula diana de interés, incluyendo, pero sin limitación, una célula tumoral. El predireccionamiento de una célula diana podría usarse para estudios de formación de imágenes o con fines inmunoterápicos.

10 En una realización del método de la invención, el primer brazo Fab del anticuerpo biespecífico se une a una célula tumoral, tal como una proteína de superficie de célula tumoral o un hidrato de carbono de superficie de célula tumoral, tal como una de las proteínas de superficie de célula tumoral enumeradas en el presente documento, y el segundo brazo Fab reconoce una molécula efectora radiactiva que incluye, pero sin limitación, un radiomarcador acoplado o unido (a través de un quelante) a un péptido o hapteno. Un ejemplo de dicho péptido radiomarcado es el ácido dietilentriaminopentaacético marcado con indio (anti-DTPA(In) van Schaijk *et al. Clin. Cancer Res.* 2005; 11:7230s-7126s). Otro ejemplo es el uso de partículas coloidales marcadas con hapteno, tales como liposomas, nanopartículas de micelas poliméricas que portan radionúclidos tales como, por ejemplo, tecnecio-99 (Jestin *et al. Q J Nucl Med Mol Imaging* 2007;51:51-60).

20 En otra realización, se usa una molécula citostática alternativa acoplada a hapteno, tal como una toxina.

En una realización adicional del método de la invención, el primer brazo Fab de la molécula de anticuerpo biespecífico está glicosilado en la posición N297 (numeración EU) y el segundo brazo Fab de las moléculas de anticuerpo biespecífico está aglicosilado (no glicosilado, por ejemplo, mediante la mutación de N297 a Q o A o E (Bolt S *et al., Eur J Immunol* 1993, 23:403-411)). La glicosilación asimétrica en la región Fc repercute en la interacción con los receptores Fcγ y tiene una repercusión en el efecto de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos del anticuerpo (Ha *et al., Glycobiology*, 5 de abril de 2011) así como la interacción con otras moléculas con función efectora tales como C1q.

30 En otra realización del método de la invención, el primer brazo Fab de la molécula de anticuerpo biespecífico interactúa con FcRn, el receptor de Fc neonatal (Roopenian DC, *et al. Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7:715-725) y el segundo brazo Fab está alterado en la unión a FcRn mediante la mutación del sitio de interacción de FcRn en las moléculas, por ejemplo, realizando una mutación H435A (Shields, R.L., *et al., J Biol Chem*, 2001, Firan, M., *et al., Int Immunol*, 2001).

35 En otra realización del método de la invención, el primer brazo Fab de la molécula de anticuerpo biespecífico interactúa con proteína A estafilocócica (proteína A, Deisenhofer *et al., Biochemistry* 20, 2361-2370 (1981) y proteína G estreptocócica (proteína G, Derrick *et al., Nature* 359, 752-754 (1992), con frecuencia utilizadas para la purificación de anticuerpos, y el segundo brazo Fab de las moléculas de anticuerpo biespecífico está alterado en la interacción con la proteína A de G. Como resultado, la eliminación de cantidades residuales de anticuerpo homodimérico con unión alterada a proteína A o G después del intercambio en heterodimérico se obtiene fácilmente mediante la purificación de la molécula biespecífica con proteína A o G.

En otra realización, la unión a los receptores Fcγ o FcRn mejora o disminuye en uno de los dos brazos Fab de la molécula de anticuerpo biespecífico.

45 En otra realización, la unión a C1q mejora o disminuye en uno de los dos brazos Fab de la molécula de anticuerpo biespecífico.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico se ha diseñado para potenciar la activación del complemento en uno o ambos de los dos brazos Fab de la molécula.

En otra realización, cada uno de los brazos Fab presentes en la molécula de anticuerpo biespecífico deriva de una subclase de IgG diferente.

55 En otra realización, cada uno de los brazos Fab presentes en la molécula de anticuerpo biespecífico porta diferentes mutaciones alotípicas (Jefferis y Lefranc, 2009, *MABs* 1:332-8).

En otra realización, otra categoría de moléculas inmunoterápicas asimétricas se genera mediante fusión de citocinas inmunoactivas, inmunoestimuladoras o inhibidoras al extremo N o al extremo C de uno o ambos de los brazos Fab presentes en las moléculas de anticuerpo biespecífico. Esto puede repercutir positivamente en la actividad antitumoral de la molécula biespecífica. Son ejemplos de dichas moléculas, sin embargo no limitadas a la lista a continuación, IL-2 (Fournier *et al.,* 2011, *Int. J. Oncology*, doi: 10.3892/ijo.2011.976), IFN-α, IFN-α2 o IFN-α2b (Huan *et al.,* 2007; *J. Immunol.* 179:6881-6888, Rossie *et al.,* 2009; *Blood* 114: 3864-3871), TNF-α. Como alternativa, la fusión N-terminal o C-terminal de citocinas, tales como, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6 o IL-13 pueden repercutir positivamente en la función efectora de la molécula de anticuerpo biespecífico. Como alternativa, se incluye un factor (de crecimiento) o un agente estimulador o inhibidor de hormonas en las moléculas en el extremo N o el extremo C.

En otra realización, la fusión N-terminal o C-terminal de un péptido lítico, tal como, por ejemplo, péptidos antimicrobianos como magainina, mellitina, cecropina, KLAKKLAK y variantes de los mismos (Schweizer *et al.* *Eur. J. Pharmacology* 2009; 625: 190-194, Javadpour, *J. Med. Chem.*, 1996, 39: 3107-3113, Marks *et al.*, *Cancer Res* 2005; 65:2373-2377, Rege *et al.*, *Cancer Res.* 2007; 67:6368-6375) o péptidos líticos catiónicos (tecnología CLYP, documento US2009/0269341) en uno o ambos de los brazos Fab, puede potenciar la actividad de la molécula.

Como alternativa, pueden generarse combinaciones de cualquiera de las moléculas de anticuerpo asimétricas mencionadas anteriormente mediante el método de la invención.

Incluso en un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende una primera cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que comprende una primera región Fc, comprendiendo dicha primera región Fc una primera región CH3, y una segunda cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que comprende una segunda región Fc, comprendiendo dicha segunda región Fc una segunda región CH3, en donde dicha primera cadena pesada se une a un primer epítipo y dicha segunda cadena pesada se une a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes, y en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y

en donde dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central y dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 (numeración EU) y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central.

En una realización, las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son de manera que las constantes de disociación de las interacciones homodiméricas de cada una de las regiones CH3 están entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, incluso más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 cuando se someten a ensayo como se describe en el Ejemplo 21.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención comprende cualquiera de las características adicionales descritas anteriormente para los métodos de producción.

Por lo tanto, en una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, dicho primer polipéptido es una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humano.

En otra realización del anticuerpo biespecífico de la invención, dicho segundo polipéptido es una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humano.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, dichas cadenas pesadas primera y segunda son ambas cadenas pesadas de longitud completa de dos anticuerpos humanos que se unen a diferentes epítipos. Este anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo de cadena pesada o un anticuerpo que, además de las cadenas pesadas, comprende dos cadenas ligeras de longitud completa, que pueden ser idénticas o diferentes.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, la región Fc del primer polipéptido es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (excepto por las mutaciones especificadas) y la región Fc del segundo polipéptido es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (excepto por las mutaciones especificadas).

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, las regiones Fc de ambas cadenas pesadas primera y segunda son del isotipo IgG1.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, una de las regiones Fc de dichos polipéptidos es del isotipo IgG1 y la otra del isotipo IgG4.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, la fuerza aumentada de la interacción heterodimérica en comparación con cada una de las interacciones homodiméricas se debe a modificaciones de CH3 distintas de la introducción de enlaces covalentes, restos cisteína o restos con carga.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, la interacción heterodimérica entre dichos polipéptidos primero y segundo en la proteína heterodimérica es de manera que no puede producirse ningún intercambio de brazos Fab a GSH 0,5 mM en las condiciones descritas en el Ejemplo 13.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, la interacción heterodimérica entre dichos

polipéptidos primero y segundo en la proteína heterodimérica resultante es de manera que no se produce ningún intercambio de brazos Fab *in vivo* en ratones en las condiciones descritas en el Ejemplo 14.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, dicha primera región CH3 comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409, y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, dicha primera región CH3 comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409, y dicha segunda región CH3 comprende una Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico de la invención, dicho primer y/o dicho segundo polipéptido comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn.

Antígenos diana

Como se ha explicado anteriormente, el anticuerpo biespecífico comprende dos regiones variables que difieren en la especificidad de unión, es decir, se unen a diferentes epítopos.

En principio, es posible cualquier combinación de especificidades. Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos biespecíficos pueden usarse potencialmente para superar algunas de las limitaciones de los anticuerpos monoespecíficos. Una posible limitación de un anticuerpo monoespecífico es la falta de especificidad para las células diana deseadas debido a la expresión del antígeno diana en otros tipos celulares hacia los cuales no se desea ninguna unión de anticuerpo. Por ejemplo, un antígeno diana sobreexpresado en células tumorales también puede expresarse en tejidos sanos, lo que podría dar como resultado efectos secundarios no deseados tras el tratamiento con un anticuerpo dirigido contra ese antígeno. Un anticuerpo biespecífico que tenga una especificidad adicional contra una proteína que se expresa exclusivamente en el tipo celular diana podría mejorar potencialmente la unión específica a las células tumorales.

Por lo tanto, en una realización de la invención, dichos epítopos primero y segundo se ubican en la misma célula, por ejemplo, una célula tumoral. Las dianas adecuadas en las células tumorales incluyen, pero sin limitación, las siguientes: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de la envoltura de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM y MRP3. Las posibles combinaciones de dianas de células tumorales incluyen, pero sin limitación: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

En una realización adicional, dichos epítopos primero y segundo pueden estar ubicados en el mismo antígeno diana, en donde la ubicación de los dos epítopos en el antígeno diana es de manera que la unión de un anticuerpo a un epítipo no interfiere con la unión del anticuerpo al otro epítipo. En una realización del presente documento, dichas proteínas homodiméricas primera y segunda son anticuerpos que se unen a dos epítopos diferentes ubicados en el mismo antígeno diana, pero tienen un modo de acción diferente para destruir la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral. Por ejemplo, en una realización, el antígeno diana es erbB2 (HER2) y el anticuerpo biespecífico combina los sitios de unión a antígeno de pertuzumab y trastuzumab. En otra realización, el antígeno diana es erbB1 (EGFR) y el anticuerpo biespecífico combina los sitios de unión a antígeno de zalutumumab y nimotuzumab.

Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse como mediadores para redirigir los mecanismos efectores a los tejidos asociados a enfermedad, por ejemplo, tumores. Por lo tanto, en una realización adicional, dicho primer o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral, tal como una proteína de célula tumoral o un hidrato de carbono de célula tumoral, y el otro epítipo se ubica en una célula efectora.

En una realización, la célula efectora es un linfocito T.

Las posibles dianas en células efectoras pueden incluir las siguientes: FcγRI (CD64): expresado en monocitos y macrófagos y neutrófilos activados; FcγRIII (CD16): expresado en linfocitos citolíticos naturales y macrófagos; CD3: expresado en linfocitos T circulantes; CD89: expresado en PMN (neutrófilos polimorfonucleares), eosinófilos, monocitos y macrófagos; CD32a: expresado en macrófagos, neutrófilos, eosinófilos; FcεRI expresado en basófilos y mastocitos. En una realización, el epítipo se ubica en CD3 expresado en linfocitos T.

En otra realización, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para un microorganismo patógeno y el segundo anticuerpo tiene especificidad de unión para una proteína de la célula efectora, tal como CD3, CD4, CD8, CD40, CD25, CD28, CD16, CD89, CD32, CD64, FcεRI o CD1.

- 5 Además, pueden usarse anticuerpos biespecíficos para dirigir un agente quimioterápico de manera más específica a las células sobre las que debería actuar el agente. Por lo tanto, en una realización, una de las proteínas homodiméricas es un anticuerpo que reconoce una molécula pequeña o péptido, o es capaz de formar un enlace covalente con una molécula de este tipo, por ejemplo, de acuerdo con el principio descrito en Rader *et al.*, (2003) *PNAS* 100:5396. En una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para (es decir, se une a un epítipo en) una célula tumoral o una proteína de superficie de célula tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, EGFR3vIII, CEA, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, EPCAM, c-Met, AXL, L1-CAM, Factor tisular, CD74 o CXCR5, y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para un agente quimioterápico, tal como una toxina (incluido un péptido radiomarcado), un fármaco o un profármaco.
- 10
- 15 Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para dirigir a una vesícula, por ejemplo, una vesícula densa en electrones, o minicélula que contiene una toxina, fármaco o profármaco a un tumor. Véase, por ejemplo, MacDiarmid *et al.* (2009) *Nature Biotech* 27:643. Las minicélulas son células acromosómicas que son producto de una división celular aberrante y que no contienen ADN cromosómico. Por lo tanto, en otra realización, en donde dicho primer o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral, tal como una proteína de célula tumoral o un hidrato de carbono de una célula tumoral, y el otro epítipo se ubica en una vesícula densa en electrones o minicélula.
- 20

- Además, la semivida sérica de un anticuerpo puede alterarse mediante la inclusión en un anticuerpo biespecífico de una especificidad de unión para una proteína sérica. Por ejemplo, la semivida sérica puede prolongarse mediante la inclusión en un anticuerpo biespecífico, de una especificidad de unión para albúmina sérica. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para una célula tumoral o proteína de célula tumoral, tal como erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de la envoltura de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM o MRP3, CEA y el segundo anticuerpo tienen una especificidad de unión para una proteína sanguínea, tal como albúmina sérica. También puede usarse una segunda especificidad de unión para dirigir un anticuerpo a un tejido específico, tal como el sistema nervioso central o el cerebro (a través de la barrera hematoencefálica). Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para una diana específica del cerebro, tal como beta amiloide (por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer), Her-2 (por ejemplo, para el tratamiento de metástasis de cáncer de mama en el cerebro), EGFR (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer cerebral primario), Nogo A (por ejemplo, para el tratamiento de lesiones cerebrales), TRAIL (por ejemplo, para el tratamiento del VIH), alfa-sinucleína (por ejemplo, para el tratamiento del Parkinson), Htt (por ejemplo, para el tratamiento del Huntington), un prión (por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de las vacas locas), una proteína del virus del Nilo Occidental, y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína de la barrera hematoencefálica, tal como receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor de melanotransferrina (MTfR), receptor de lactoferrina (LfR), receptor 2 de Apolipoproteína E (ApoER2), proteína 1 y 2 relacionada con el receptor de LDL (LRP1 y LRP2), receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE), receptor de toxina diftérica = factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (DTR = HB-EGF), gp190 (Abbott *et al.*, *Neurobiology of Disease* 37 (2010) 13-25).
- 25
- 30
- 35
- 40

- Una especificidad de unión para una proteína de la barrera hematoencefálica también puede usarse para dirigir otra molécula, distinta de anticuerpo, a un tejido específico, tal como el sistema nervioso central o el cerebro (a través de la barrera hematoencefálica). Por lo tanto, en una realización adicional, una de las proteínas homodiméricas es un anticuerpo de longitud completa que tiene una especificidad de unión para una proteína de la barrera hematoencefálica (tal como TfR, receptor de insulina, MTfR, LfR, ApoER2, LRP1, LRP2, RAGE, DTR (= HB-EGF) o gp190) y la otra proteína homodimérica es una región Fc unida en el extremo N o C a otra proteína, tal como una citocina, un receptor soluble u otra proteína, por ejemplo, VIP (péptido intestinal vasoactivo), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), múltiples FGF, EGF (factor de crecimiento epidérmico), PNA (ácido nucleico peptídico), NGF (factor de crecimiento neuronal), Neurotrofina (NT)-3, NT-4/5, factor neurotrófico derivado de la glía, factor neurotrófico ciliar, neurturina, neuregulinas, interleucinas, factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa, TGF-beta, eritropoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, artemina, persefina, netrinas, cardiotrofina-1, factor de células madre, midcina, pleiotrofina, proteínas morfogénicas óseas, saposinas, semaforinas, factor inhibidor de leucocitos, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, arilsulfatasa B, alfa-glucosidasa ácida o esfingomielinasa (Pardridge, *Biopharmaceutical drug targeting to the brain, Journal of Drug Targeting* 2010, 1-11; Pardridge, *Re-engineering Biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses. Bioconjugate Chemistry* 2008, 19: 1327-1338).
- 45
- 50
- 55
- 60

- Por otra parte, puede usarse una segunda especificidad de unión para dirigir los factores de coagulación sanguínea a un sitio de acción deseado particular. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que tiene una primera especificidad de unión para una célula tumoral y una segunda especificidad de unión para un factor de coagulación sanguínea podría dirigir la coagulación sanguínea a un tumor y, por lo tanto, detener el crecimiento del tumor. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para una célula
- 65

tumoral o proteína de célula tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5, y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína implicada en la coagulación sanguínea, como el factor tisular.

- 5 Combinaciones adicionales de especificidad de unión particularmente interesantes incluyen: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSF + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR
- 10 + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA de clase II, CD38 + CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + brazo no de unión y combinaciones de receptores acoplados a proteína G.

- 15 En una realización adicional, los anticuerpos bispecíficos de acuerdo con la invención pueden usarse para eliminar patógenos, autoanticuerpos patógenos o compuestos dañinos tales como venenos y toxinas de la circulación mediante el direccionamiento a eritrocitos esencialmente como se describe en Taylor *et al. J. Immunol.* 158:842-850 (1997) y Taylor y Ferguson, *J. Hematother.* 4:357-362, 1995. Dicho primer epítipo se ubica en una proteína del eritrocito (glóbulo rojo) incluyendo, pero sin limitación, el receptor 1 del complemento de eritrocitos y dicho segundo epítipo se ubica en el compuesto u organismo que ha de ser la diana para la eliminación.

- 20 En una realización adicional, el segundo brazo Fab comprende una proteína de fusión que representa un autoantígeno o un sitio de conjugación para unir un autoantígeno tal como ADNbc. Por lo tanto, el direccionamiento de patógenos, autoanticuerpos o compuestos nocivos por los anticuerpos bispecíficos de la invención, seguido de una eliminación mediada por eritrocitos, puede tener utilidad terapéutica en el tratamiento de diversas enfermedades y síndromes.

25 *Conjugación*

- En realizaciones adicionales de la invención, la primera y/o segunda cadena pesada de anticuerpo de longitud completa se une a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: una toxina (incluyendo un radioisótopo), un profármaco o un fármaco. Dicho compuesto puede hacer que la destrucción de células diana sea más eficaz, por ejemplo, en la terapia contra el cáncer. El anticuerpo bispecífico resultante es, por lo tanto, un inmunoconjugado. El compuesto puede acoplarse como alternativa al anticuerpo bispecífico resultante, es decir, después de que se haya producido el intercambio de brazos Fab.

- 35 Los compuestos adecuados para formar los inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidro-testosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estrepto-zotocina, dacarbacina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (antes actinomicina)), bleomicina, daunorrubicina (antes daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como la cadena A diftérica y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas), toxina de ricina (como la ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina colérica, una toxina similar a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertúsica, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de la soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de
- 40 *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antivírica de fitolaca, toxina diftérica, endotoxina de *Pseudomonas*, Maitansinoides, Auristatinas (MMAE, MMAF), Caliqueamicinas y análogos de Duocarmicina (Ducry y Stump, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21: 5-13), Dolostatina-10, Dolostatina-15, Irinotecán o su metabolito activo SN38, pirrolobenzodiazepinas (PBD).

- 55 En una realización adicional de la invención, la primera y/o segunda cadena pesada del anticuerpo de longitud completa se une a un emisor alfa, incluyendo, pero sin limitación, Torio-227, Radio-223, Bismuto-212 y Actinio-225.

- 60 En una realización adicional de la invención, la primera y/o segunda cadena pesada del anticuerpo de longitud completa se une a un radionúclido emisor beta, incluyendo, pero sin limitación, Yodo-313, Itrio-90, Flúor-18, Renio-186, Galio-68, Tecnecio-99, Indio-111 y Lutecio-177.

- 65 En otra realización, el compuesto que ha de conjugarse comprende un ácido nucleico o una molécula asociada a ácido nucleico. En una de dichas facetas de la presente invención, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNip) o un

ácido nucleico inmunoestimulador (por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un motivo CpG inmunoestimulador).

Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para la conjugación, incluyendo los métodos descritos en Hunter *et al.*, *Nature* 144, 945 (1962), David *et al.*, *Biochemistry* 13, 1014 (1974), Pain *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 40, 219 (1981) y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982). Los conjugados pueden producirse conjugando químicamente el otro resto con el lado N-terminal o el lado C-terminal de la proteína (véase, por ejemplo, *Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Dichos derivados de anticuerpos conjugados también pueden generarse mediante conjugación en restos o azúcares internos, cuando corresponda. Los agentes pueden acoplarse directa o indirectamente a una proteína de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento mediante un resto espaciador. Ducry y Stump recientemente han resumido tecnologías de unión para conjugados de fármacos en (2010) *Bioconjugate Chem.* 21: 5.

Composiciones y usos

Cualquier referencia a un método de tratamiento practicado en el cuerpo humano o animal ha de interpretarse como sustancias o composiciones para su uso en dicho tratamiento.

En un aspecto principal adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un biespecífico de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con técnicas convencionales tales como las divulgadas en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir, por ejemplo, diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosforoso y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de dispersión, conservantes o tampones, que pueden potenciar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Generalmente, los expertos en la materia conocen métodos para la preparación de dichas formulaciones.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes, por ejemplo, enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración esterilizante.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos anteriores del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. "Administración por vía parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, por lo general mediante inyección, e incluyen la inyección y la infusión epidérmicas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intratecales, intracapsulares, intraorbitales, intracardiácas, intradérmicas, intraperitoneales, intratendinosas, transtraqueales, subcutáneas, subcuticulares, intraarticulares, subcapsulares, subaracnoideas, intraespinales, intracraneales, intratorácicas, epidurales e intraesternales.

En una realización, esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

En un aspecto principal, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, para su uso como medicamento. El anticuerpo biespecífico de la invención puede usarse para una serie de fines. En particular, como se ha explicado anteriormente, los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden usarse para el tratamiento de diversas formas de cáncer, incluyendo el cáncer metastásico y el cáncer refractario.

Por lo tanto, en el presente documento también se describe un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación y/o para destruir una célula tumoral que comprende la administración de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento a un individuo que lo necesite.

En otra realización, los anticuerpos biespecíficos de la invención se usan para el tratamiento de enfermedades inmunitarias y autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del SNC y musculoesqueléticas.

Las pautas de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una única dosis en embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

Las dosificaciones eficientes y las posologías para los anticuerpos biespecíficos dependen de la enfermedad o afección que se ha de tratar y pueden ser determinadas por los expertos en la materia. Un intervalo de ejemplo, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico de la presente invención es de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como, aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como, aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente tal como 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5 o aproximadamente 8 mg/kg.

Un médico o veterinario que tenga experiencia habitual en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis del anticuerpo biespecífico empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. La administración puede ser, por ejemplo, parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Un anticuerpo biespecífico de la invención también puede administrarse profilácticamente con el fin de reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, tal como el cáncer, retrasar el inicio de la aparición de un evento en la progresión de la enfermedad y/o reducir el riesgo de reaparición cuando una enfermedad, tal como el cáncer, está en remisión.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos de interés para la enfermedad o afección que ha de tratarse. En consecuencia, en una realización, el medicamento que contiene anticuerpos biespecíficos es para su combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes citotóxicos, quimioterápicos o antiangiogénicos. Dicha administración combinada puede ser simultánea, por separado o secuencial. También se describe un método para tratar o prevenir enfermedades, tales como el cáncer, método que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico de la presente invención, en combinación con radioterapia y/o cirugía.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención también pueden usarse con fines diagnósticos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vectores de expresión para la expresión de IgG1-2F8 e IgG1-7D8 humanas

Las regiones codificantes VH y VL de HuMab 2F8 (documento WO 02/100348) y HuMab 7D8 (documento WO 04/035607) se clonaron en el vector de expresión pConGlf (que contenía la secuencia genómica de la región constante del alotipo IgGlf humano (Lonza Biologics)) para la producción de la cadena pesada de IgG1 humana y pConKappa (que contenía la región constante de cadena ligera kappa humana, Lonza Biologics) para la producción de la cadena ligera kappa. Para los anticuerpos IgG4, las regiones VH se insertaron en el vector pTomG4 (que contenía la secuencia genómica de la región constante de IgG4 humana en el vector pEE12.4 (Lonza Biologics)). Como alternativa, en construcciones de seguimiento, se usaron vectores que contenían las regiones codificantes con codones totalmente optimizados de la cadena pesada (IgG1 o IgG4) en el vector pEE12.4 o la cadena ligera kappa humana de HuMab 2F8 o HuMab 7D8 en el vector pEE6.4 (Lonza Biologics).

Ejemplo 2 Vectores de expresión para la expresión de IgG1-2F8 con bisagra suprimida y fragmentos CH2-CH3 de IgG1 e IgG4 humanas que contienen mutaciones específicas

Para introducir mutaciones en las regiones bisagra y CH3 de las cadenas pesadas de anticuerpo, se usó un kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Como alternativa, las construcciones se sintetizaron totalmente o se clonaron regiones VH en un vector que ya contenía las sustituciones codificantes de aminoácidos específicas.

Las construcciones que codificaban los fragmentos CH2 y CH3 se construyeron mediante PCR o se sintetizaron con codones totalmente optimizados. Estas construcciones tenían un péptido señal N-terminal y un marcador His de 6 aminoácidos y contenían los aminoácidos 341-447 de la región constante IgG1/4 humana. Las construcciones se clonaron en pEE12.4.

Para construir moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1), se fabricó una construcción de ADN sintético que codificaba el formato Uni-G1 para isotipos de IgG1 humana con especificidad de EGFR. En esta construcción se suprimió la región bisagra natural (como se define por el exón de bisagra). Se realizó una mutación adicional de Ser a Cys en la posición 158 en la construcción de IgG1 para rescatar el enlace Cys entre las cadenas HC y LC en este subtipo. La secuencia de proteína se muestra a continuación. La construcción se insertó en el vector pEE6.4 y se denominó pHG1-2F8.

```
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYG
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVT
SSASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Ejemplo 3: Vectores de expresión para la expresión de IgG4-2F8 e IgG4-7D8 de macaco de la India

Se sintetizaron vectores que contenían las regiones codificantes para las cadenas pesadas y ligeras kappa de IgG4 del macaco de la India chino y las regiones VH y VL de Humab 2F8 y 7D8, con codones totalmente optimizados, y se insertaron en pEE12.4 (cadena pesada) y pEE6.4 (cadena ligera). La secuencia de región constante de cadena pesada utilizada (basándose en las secuencias descritas por Scinicariello *et al.*, *Immunology* 111: 66-74, 2004) fue la siguiente (alineada a la secuencia humana):

IgG4 humana	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IgG4 de macaco de la India (Ch)	-STKGPSVFPLASCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IgG4 humana	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
IgG4 de macaco de la India (Ch)	TFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYVCNWHEPSNTKVDKRVEFT--
IgG4 humana	PPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEV

IgG4 de macaco de la India (Ch)	PPCPACPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWWDVVSQEDPEV
IgG4 humana	QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
IgG4 de macaco de la India (Ch)	QFNWYVDGAEVHHAQTKPRERQFNSTYRWSVLTVTHQDWLNGKEYTCKV
IgG4 humana	SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
IgG4 de macaco de la India (Ch)	SNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYILPPPEELTKNQVSLTCLVTGFY
IgG4 humana	PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
IgG4 de macaco de la India (Ch)	PSDIAVEWESNGQPENTYKTTTPVLDSDGSYLLYSKLTVNKSRWQPGNIF
IgG4 humana	SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
IgG4 de macaco de la India (Ch)	TCSVMHEALHNHYTQKSLSVSPGK

La secuencia de región constante de cadena ligera (CL) de macaco de la India utilizada fue:

AVAAPSVFIFPPSEDQVKSGTVSVVCLLNFPREASVKKVVDGVLKGTNSQESVTEQDSKDN
 TYSLSSTLTLSSTDYQSHNVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

Ejemplo 4: Producción de anticuerpos mediante expresión transitoria en células HEK-293F

Se produjeron anticuerpos, en condiciones sin suero, mediante cotransfección de vectores de expresión de cadena pesada y ligera relevantes en células HEK-293F (Invitrogen), usando 293fectin (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

Ejemplo 5: Purificación de anticuerpos IgG1 e IgG4

Se purificaron anticuerpos IgG1 e IgG4 mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Los sobrenadantes del cultivo celular se filtraron a través de un filtro sin salida de 0,20 µm, seguido de la carga en una columna de proteína A de 5 ml (rProteína A FF, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y la elución de la IgG con ácido cítrico 0,1 M-NaOH, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se dializó durante la noche a fosfato de sodio 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun, Oss, Países Bajos). Después de la diálisis, las muestras se esterilizaron por filtración sobre un filtro sin salida de 0,20 µm. La concentración de las IgG purificadas se determinó mediante nefelometría y absorbancia a 280 nm. Las proteínas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE, IEF, espectrometría de masas y glicanálisis.

15

20

Ejemplo 6: Purificación de fragmentos CH2-CH3

Las proteínas CH2-CH3 marcadas con His se purificaron mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (Ni²⁺) (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania), desalada usando columnas PD-10 (GE Healthcare) equilibradas con PBS y filtradas-esterilizadas sobre filtros sin salida de 0,2 µm. La concentración de las proteínas purificadas se determinó mediante absorbancia a 280 nm. La calidad de las proteínas purificadas se analizó mediante SDS-PAGE.

25

30

Ejemplo 7: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por GSH entre anticuerpos IgG4 humanos y de macaco de la India

Como se ha mencionado anteriormente, El documento WO 2008119353 (Genmab) describe un método *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos en donde un anticuerpo biespecífico se forma mediante intercambio de "brazos Fab" o "media molécula" (intercambio de una cadena pesada y una cadena ligera fijada) entre dos anticuerpos IgG4 o similares a IgG4 mono-específicos tras incubación en condiciones reductoras. Esta reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro en donde los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en las regiones bisagra de los anticuerpos mono-específicos se reducen y las cisteínas libres resultantes forman un nuevo enlace disulfuro entre cadenas pesadas con restos cisteína de otra molécula de anticuerpo con una especificidad diferente. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab con secuencias diferentes.

35

40

Para someter a ensayo el intercambio de brazos Fab entre anticuerpos IgG4 humanos y de macaco de la India, se usaron IgG4-2F8 humana (anti-EGFR), IgG4-7D8 humana (anti-CD20), IgG4-2F8 de macaco de la India y IgG4-7D8 de macaco de la India para realizar todas las combinaciones posibles de dos anticuerpos. Para el intercambio de brazos Fab *in vitro*, las mezclas de anticuerpos, que contenían cada anticuerpo a una concentración final de 4 µg/ml en 0,5 ml de PBS con glutatión reducido 0,5 mM (GSH), se incubaron a 37 °C durante 24 h. Para detener la reacción de reducción, se añadieron 0,5 ml de PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST) a la mezcla de reacción.

45

La presencia de anticuerpos biespecíficos se sometió a ensayo mediante la determinación de la unión biespecífica usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich. Las placas de ELISA (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) se recubrieron durante la noche con 2 µg/ml (100 µl/pocillo) de dominio extracelular recombinante de EGFR en PBS a 4 °C. Las placas se lavaron una vez con PBST. Se transfirieron series de diluciones de las muestras de anticuerpos (0-1 µg/ml en diluciones con factor de dilución 3) en PBST/BSA al 0,2 % (PBSTB) a las placas ELISA recubiertas (100 µl/pocillo) y se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) durante 60 min a temperatura ambiente (TA). Se desecharon las muestras y las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). A continuación, las placas se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) con 2 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-idiotípico de ratón 2F2 SAB1.1 (dirigido contra 7D8; Genmab) en PBTB (100 µl/pocillo) durante 60 min. Las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). A continuación, las placas se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (15G; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, EE. UU.; 1:5.000) en PBSTB (100 µl/pocillo) durante 60 min a TA. Las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). Se añadió ABTS (50 mg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) (100 µl/pocillo) y se incubaron protegidas de la luz durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido oxálico al 2 % (100 µl/pocillo; Riedel de Haen Seelze, Alemania). Después de 10 min a TA, se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

La Figura 1 muestra que una combinación de IgG4 humana y de macaco de la India dio como resultado más unión biespecífica (una DO 405 nm superior) en comparación con cada una de las combinaciones de moléculas de IgG4 de la misma especie. Estos datos muestran que se produce intercambio de brazos Fab entre la IgG4 humana y la IgG4 de macaco de la India. Por otra parte, la unión biespecífica superior sugiere que las semimoléculas de IgG4 humana muestran una dimerización preferente con respecto a las semimoléculas de IgG4 de macaco de la India (heterodimerización), dando como resultado un equilibrio de la reacción de intercambio de brazos Fab que se desplaza hacia el heterodímero biespecífico en lugar de un intercambio estocástico con 50 % de heterodímero y 50 % de homodímeros.

Ejemplo 8: Análisis de secuencia de IgG4 humana y de macaco de la India

Se ha descrito que la capacidad de un anticuerpo para participar en el intercambio de brazos Fab implica el tercer dominio constante (CH3) además de una región bisagra denominada permisiva (por ejemplo, que contiene CPSC) que sólo requiere un entorno reductor para activarse (Van der Neut Kolfshoten, 2007, *Science*). Para los anticuerpos humanos, se descubrió que el intercambio de brazos Fab era una característica inherente de IgG4, caracterizada por una arginina (R) en la posición 409 en el dominio CH3 y una bisagra permisiva (226-CPSC-229) (véase el documento WO 2008145142 (Genmab)). Por el contrario, la IgG1 humana, que no participa en el intercambio de brazos Fab, tiene una lisina (K) en la posición 409 y una bisagra estable (es decir, no permisiva) (226-CPPC-229) (numeración EU, véase también la Figura 16).

En un intento de dilucidar el aumento del intercambio de brazos Fab entre IgG4 humana y de macaco de la India en comparación con el intercambio de brazos Fab entre moléculas de IgG4 de la misma especie, se analizaron los aminoácidos de la bisagra central y de la interfaz CH3-CH3 de los anticuerpos humanos y de macaco de la India (véase, por ejemplo, Dall'Acqua, *et al.* (1998) *Biochemistry* 37:9266 para consultar una visión de conjunto de los restos de la interfaz CH3-CH3 humana). La Figura 2 muestra que la secuencia de bisagra central en IgG4 de macaco de la India china es 226-CPAC-229 y que el dominio CH3 contiene una lisina (K) en la posición 409. Además, la alineación de secuencias mostró que la IgG4 de macaco de la India se caracteriza por tres sustituciones de aminoácidos más en la interfaz CH3-CH3 en comparación con la IgG4 humana: isoleucina (I) en la posición 350 en macaco de la India frente a treonina (T) en ser humano; treonina (T) en la posición 370 en macaco de la India frente a lisina (K) en ser humano; y leucina (L) en la posición 405 en macaco de la India frente a fenilalanina (F) en ser humano.

Ejemplo 9: Generación de anticuerpos biespecíficos usando intercambio de brazos Fab inducido por GSH entre IgG4 humana e IgG1 humana que contienen secuencias CH3 de IgG4 de macaco de la India

Se ha descrito para los anticuerpos humanos, que para permitir que se produzca intercambio de brazos Fab en moléculas de IgG1, reemplazar la secuencia de bisagra central de IgG1 (CPPC) con la secuencia de IgG4 humana (CPSC) por una sustitución P228S no tuvo efecto, pero que la mutación de CH3 a una secuencia similar a IgG4 era necesaria para la actividad de intercambio de brazos Fab (Van der Neut Kolfshoten, 2007, *Science*).

Basándose en el intercambio de brazos Fab entre IgG4 humana y de macaco de la India descrito en el Ejemplo 7, se analizó si la secuencia CH3 de IgG4 de macaco de la India china podría activar la IgG1 humana para el intercambio de brazos Fab. Por lo tanto, la triple mutación T350I-K370T-F405L (denominada ITL en lo sucesivo en el presente documento) se introdujo en la IgG1-2F8 humana además de la mutación P228S que da como resultado la secuencia de bisagra CPSC. Los mutantes IgG1-2F8 humanos se combinaron con IgG4-7D8 humana para el intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por GSH. Las mezclas de anticuerpos, que contenían cada anticuerpo a una concentración final de 4 µg/ml en 0,5 ml de PBS con GSH 0,5 mM, se incubaron a 37 °C durante 0-3-6-24 h. Para detener la reacción de reducción, se añadieron 0,5 ml de PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST) a la mezcla de reacción. Se realizaron mediciones de la unión biespecífica en un ELISA como se describe en el Ejemplo 7.

La Figura 3 confirma que la introducción de una bisagra CPSC por sí sola no hace participar la IgG1-2F8 humana para el intercambio de brazos Fab inducido por GSH cuando se combina con la IgG4-7D8 humana. Además, la introducción de los aminoácidos de la interfaz CH3 específicos de IgG4 de macaco de la India (ITL) en IgG1-2F8 humana, aunque conservando la bisagra de IgG1 de tipo silvestre, no dio como resultado la participación en el intercambio de brazos Fab cuando se combinó con IgG4-7D8 humana en estas condiciones. Por el contrario, una secuencia de cadena principal de IgG1-2F8 humana variante que alberga tanto una secuencia CPSC en la bisagra como los aminoácidos de la interfaz CH3 específicos de IgG4 de macaco de la India (ITL) mostró una mayor unión biespecífica después del intercambio de brazos Fab inducido por GSH con IgG4-7D8 humana en comparación con dos anticuerpos IgG4 humanos. Estos datos muestran que una bisagra que contiene CPSC en combinación con un dominio CH3 que contiene I, T y L en las posiciones 350, 370 y 405, respectivamente, es suficiente para hacer participar la IgG1 humana para el intercambio de brazos Fab inducido por GSH y que el equilibrio de la reacción de intercambio se desplace hacia el producto biespecífico intercambiado cuando se combina con la IgG4 humana.

Ejemplo 10: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab *in vivo* entre IgG4 humana y mutantes de IgG1 o IgG4

Para identificar adicionalmente las características necesarias para la participación en el intercambio de brazos Fab, se analizaron las variantes de IgG4 e IgG1 humanas *in vivo*. A cuatro ratones SCID hembras (Charles River, Maastricht, Países Bajos) por cada grupo se le inyectaron i.v. mezclas de anticuerpos, que contenían 600 µg de anticuerpo (500 µg de 7D8 + 100 µg de 2F8) en un volumen total de 300 µl. Se extrajeron muestras de sangre de la vena safena 3, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. La sangre se recogió en viales que contenían heparina y se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos para separar el plasma de las células. La generación de anticuerpos biespecíficos se siguió evaluando la reactividad biespecífica contra CD20 y EGFR en un ELISA usando muestras de plasma diluidas en serie en PBSTB como se describe en el Ejemplo 7. Los anticuerpos biespecíficos en muestras de plasma se cuantificaron mediante ajuste de curva de regresión no lineal (software GraphPad, San Diego, CA) usando un mezcla de anticuerpos intercambiados *in vitro* como referencia.

La Figura 4 muestra que la IgG4-2F8 humana, en la que la bisagra o la secuencia de CH3 se convierte en la secuencia de IgG1 humana correspondiente (CPPC o R409K, respectivamente), no participa en el intercambio de brazos Fab *in vivo*. A la inversa, la IgG1 humana, en la que tanto la región bisagra como las secuencias de interfaz CH3 se convierten en las secuencias de IgG4 humanas correspondientes (CPSC y K409R), es capaz de participar en el intercambio de brazos Fab *in vivo*. Estos datos muestran que una bisagra que contiene CPSC (S en la posición 228) en combinación con un dominio CH3 que contiene una arginina (R) en la posición 409 es suficiente para permitir el intercambio de brazos Fab por la IgG1 humana *in vivo*.

Ejemplo 11: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA: derivación/interrupción de una bisagra estabilizada

La 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) es un agente reductor suave que se ha descrito que escinde selectivamente los enlaces disulfuro en la región bisagra de los anticuerpos, conservando al mismo tiempo los enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras. Por lo tanto, se sometió a ensayo una serie de concentraciones de 2-MEA para determinar su capacidad para inducir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab entre dos anticuerpos que contienen regiones bisagra CPSC o CPPC. Las mezclas de anticuerpos, que contienen cada anticuerpo a una concentración final de 0,5 mg/ml, se incubaron con una serie de concentraciones de 2-MEA (0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 25,0 y 40,0 mM) en un volumen total de 100 µl de TE a 37 °C durante 90 min. Para detener la reacción de reducción, el agente reductor 2-MEA se eliminó desalando las muestras usando columnas de centrifugación (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La unión biespecífica se midió en un ELISA como se describe en el Ejemplo 7.

Se sometió a ensayo el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA para la combinación IgG4-2F8 x IgG4-7D8, que contiene regiones bisagra CPSC y se sabe que participa en el intercambio de brazos Fab inducido por GSH, y para la combinación IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, que no participa en el intercambio de brazos Fab inducido por GSH debido a las regiones bisagra estabilizadas (descritas en el Ejemplo 9, Figura 3). Sorprendentemente, se descubrió que 2-MEA induce la separación de las cadenas ligeras de las cadenas pesadas determinada mediante SDS-PAGE no reductora (datos no mostrados). No obstante, se generaron anticuerpos biespecíficos funcionales como se muestra en la Figura 5. El nivel máximo de unión biespecífica después del intercambio de brazos Fab entre IgG4-2F8 humana de tipo silvestre e IgG4-7D8 se alcanzó a una concentración de 2-MEA 2,0 mM y fue comparable al nivel alcanzado con GSH 0,5 mM como se describe en el Ejemplo 9 (Figura 3). Sin embargo, 2-MEA fue capaz de inducir el intercambio de brazos Fab entre los anticuerpos humanos IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC (con regiones bisagra estabilizadas) de una manera dependiente de la dosis. Aunque se formaron pocos o ningún anticuerpo biespecífico a bajas concentraciones de 2-MEA, probablemente debido a la presencia de una secuencia CPPC en la región bisagra de ambos anticuerpos, la generación de anticuerpos biespecíficos fue muy eficiente en concentraciones superiores de 2-MEA. La unión biespecífica máxima se alcanzó a 2-MEA 25 mM y superó la unión máxima después del intercambio de brazos Fab entre los dos anticuerpos IgG4 de tipo silvestre. Estos niveles máximos de unión fueron comparables a lo que se describe en el Ejemplo 9 (Figura 3) para el tratamiento con GSH del anticuerpo correspondiente con una

bisagra CPSC (IgG1-2F8-CPSC-ITL). Como IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC contienen ambos una bisagra CPPC, estos datos indican que 2-MEA podría eludir el requisito de una bisagra CPSC para el intercambio de brazos Fab *in vitro*.

5 Ejemplo 12: Espectrometría de masas para seguir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

La generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA se describe en el Ejemplo 11, donde la unión biespecífica se demostró mediante un ELISA (Figura 5). Para confirmar que se forman anticuerpos biespecíficos, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas de ionización por electronebulización (EM-IEN) para determinar los pesos moleculares. En primer lugar, las muestras se desglicosilaron incubando 200 µg de anticuerpo durante la noche a 37 °C con 0,005 U de N-glicanasa (N.º de cat. GKE-5006D; Prozyme) en 180 µl de PBS. Las muestras se desalaron en un UPLC Aquity™ (Waters, Milford, EE. UU.) con una columna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, a 60 °C y eluida con un gradiente de una mezcla de agua MQ (eluyente A) y acetonitrilo de grado CL-EM (eluyente B) (Biosolve, Valkenswaard, Países Bajos) que contenía ácido fórmico al 0,05 % (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Los espectros de masas de ionización por electronebulización de tiempo de vuelo se registraron en línea en un espectrómetro de masas microOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) funcionando en modo de iones positivos. Antes del análisis, se calibró una escala de 500-4000 m/z con una mezcla de ajuste de EN (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.). Los espectros de masas se deconvolucionaron usando la Entropía máxima que se proporciona con el software DataAnalysis™ v. 3.4 (Bruker, Bremen, Alemania). Basándose en la masa molecular de los anticuerpos utilizados para el intercambio de brazos Fab en este experimento, los anticuerpos biespecíficos pudieron discriminarse de los anticuerpos originales (también descrito en el Ejemplo 15, Figura 9C para IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC). Para el pico del anticuerpo biespecífico, se determinó el área bajo la curva y se dividió por el área bajo las curvas total para calcular el porcentaje de anticuerpos biespecíficos en cada muestra.

La Figura 6A muestra tres perfiles de espectrometría de masas representativos de la reacción de intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC con 2-MEA 0 mM (dos picos correspondientes a los anticuerpos progenitores), 2-MEA 7 mM (tres picos correspondientes a los anticuerpos progenitores y biespecíficos) y 2-MEA 40 mM (un pico correspondiente al anticuerpo biespecífico). El pico homogéneo del producto biespecífico indica que no se produjo ningún emparejamiento incorrecto de la cadena ligera, lo que habría dado como resultado picos subdivididos. Los datos cuantificados se presentan en la Figura 6B y muestran que el intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC dio como resultado casi un 100 % de anticuerpos biespecíficos. Por el contrario, el intercambio de brazos Fab entre anticuerpos IgG4 de tipo silvestre dio como resultado menos del 50 % de producto biespecífico. Estos datos confirman los resultados del ELISA de unión biespecífica descrito en el Ejemplo 11 (Figura 5).

Ejemplo 13: Estabilidad de los anticuerpos biespecíficos generados mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

Se sometió a ensayo la estabilidad de los anticuerpos biespecíficos generados mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido 2-MEA. Por lo tanto, se usaron 2 µg de una muestra biespecífica generada a partir de IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC con 2-MEA 7,0 mM (como se describe en el Ejemplo 11, Figura 5) en una reacción de intercambio de brazos Fab inducida por GSH en presencia de una serie de concentraciones (0, 2, 20, 100 µg) de IgG4 irrelevante (IgG4-MG contra el receptor de acetilcolina), lo que representa un exceso de 0, 1, 10, 50x de IgG4-MG en comparación con la muestra de ensayo biespecífica de 2 µg. El intercambio de brazos Fab en esta reacción daría como resultado la pérdida de la unión EGFR/CD20 biespecífica. Las condiciones para la reacción de reducción de GSH fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 7 (24 h a 37 °C en 0,5 ml de PBS/GSH 0,5 mM). Para detener la reacción de reducción, se añadieron 0,5 ml de PBSTB a la mezcla de reacción. La unión biespecífica se midió en un ELISA como se describe en el Ejemplo 7. La unión biespecífica después de la reacción de reducción de GSH se presenta con respecto a la unión biespecífica medida en el material de partida (control), que se fijó en el 100 %.

La Figura 7A muestra que para la muestra biespecífica derivada de IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, la unión EGFR/CD20 biespecífica no cambia significativamente después del intercambio de brazos Fab inducido por GSH en presencia de IgG4 irrelevante. Esto indica que el producto biespecífico es estable, es decir, no participa en el intercambio de brazos Fab inducido por GSH. Como control, la Figura 7B muestra que una muestra derivada de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 muestra una unión EGFR/CD20 biespecífica disminuida después del intercambio de brazos Fab inducido por GSH en presencia de IgG4 irrelevante, lo que indica que este producto no es estable. Estos datos muestran que el heterodímero que consiste en una cadena pesada de IgG1 humana que contiene la triple mutación T350I-K370T-F405L en el dominio CH3 y una cadena pesada de IgG4 humana que contiene la sustitución S228P que da como resultado una bisagra estabilizada (CPPC), es estable.

Ejemplo 14: Análisis *in vivo* de la farmacocinética y estabilidad de los anticuerpos biespecíficos generados mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

El anticuerpo biespecífico generado mediante el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA *in vitro* entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC se inyectó en ratones SCID para analizar su estabilidad (intercambio de brazos Fab *in*

vivo) y propiedades farmacocinéticas (tasa de aclaramiento plasmático) en comparación con los anticuerpos progenitores IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC. A tres grupos de ratones (3 ratones por grupo) se les inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola 200 µl de anticuerpo purificado: (1) 100 µg de anticuerpo biespecífico; (2) 100 µg de anticuerpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante (natalizumab, anti-integrina-α4); (3) 50 µg de IgG1-2F8-ITL + 50 µg de IgG4-7D8-CPPC. Se recogieron muestras de sangre (50-100 µl) mediante punción en el carrillo a intervalos de tiempo predeterminados después de la administración de anticuerpos (10 min, 3h, 1, 2, 7, 14, 21 días). La sangre se recogió en viales que contenían heparina y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 g. El plasma se almacenó a -20 °C antes de realizar más análisis.

Las concentraciones de IgG total en las muestras de plasma se sometieron a ensayo mediante ELISA. Las condiciones de ensayo de las etapas siguientes fueron las mismas que para el ELISA descrito en el Ejemplo 7. Los compuestos específicos utilizados para la medición de IgG total fueron los siguientes: cubrir con anti-IgG humana de ratón 2 µg/ml (clon MH16-1; CLB; N.º de cat. M1268); diluciones de muestras de suero (1:500 y 1:2.500 para los grupos 1 y 3) y (1:2.500 y 1:10.000 para el grupo 2); conjugado: Anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (clon 11H; Jackson; N.º de cat. 109-035-098; 1:10.000). La presencia de anticuerpos biespecíficos en las muestras de plasma se analizó y cuantificó mediante la reactividad biespecífica de CD20 y EGFR en un ELISA como se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 8A muestra las concentraciones plasmáticas totales de anticuerpos. La forma de las curvas de aclaramiento plasmático fue idéntica en todos los grupos, lo que indica que el aclaramiento plasmático del anticuerpo biespecífico fue el mismo que el de los anticuerpos progenitores IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC durante el intervalo de tiempo analizado. La Figura 8B muestra las concentraciones plasmáticas de anticuerpos biespecíficos a lo largo del tiempo. La adición de un exceso de 10 veces de IgG4 irrelevante al anticuerpo biespecífico no afectó a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos, lo que indica que no se produjo ningún intercambio de brazos Fab *in vivo*. Después de la inyección de los anticuerpos progenitores (IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC), no se detectaron anticuerpos biespecíficos en el plasma, confirmando que estos anticuerpos no participan en el intercambio de brazos Fab *in vivo*. Estos datos indican que el producto de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, era estable *in vivo* (sin intercambio de brazos Fab) y mostró propiedades farmacocinéticas comparables (tasa de aclaramiento plasmático) a las de los anticuerpos monovalentes progenitores.

Ejemplo 15: Pureza del anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre dos anticuerpos

Un lote de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL humana x IgG4-7D8-CPPC, se purificó en una columna de desalación PD-10 (N.º de cat. 17-0851-01; GE Healthcare). A continuación, la pureza del producto biespecífico se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC, por sus siglas en inglés) y espectrometría de masas. La funcionalidad del anticuerpo biespecífico generado se confirmó mediante la unión biespecífica en un ELISA (datos no mostrados).

La SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras y no reductoras en geles NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Breda, Países Bajos) usando un método Laemli modificado (Laemli 1970 *Nature* 227(5259): 680-5), donde las muestras se procesaron a pH neutro. Los geles SDS-PAGE se tiñeron con Coomassie y se obtuvieron imágenes digitales usando GeneGenius (Synoptics, Cambridge, Reino Unido). La Figura 9A muestra que la muestra de anticuerpos después del intercambio de brazos Fab consiste en IgG intacta, con una traza de medias moléculas (H1L1) detectables en el gel no reducido (Figura 9A-b).

El fraccionamiento por HP-SEC se realizó usando una unidad de separación Waters Alliance 2695 (Waters, Etten-Leur, Países Bajos) conectada a una columna de HP-SEC TSK (G3000SW_{XL}; Toso Biosciences, via Omnilabo, Breda, Países Bajos) y un detector de absorbancia dual λ Waters 2487 (Waters). Las muestras se ejecutaron a 1 ml/min. Los resultados se procesaron usando el software Empower versión 2002 y se expresaron por pico como porcentaje de la altura total del pico. La Figura 9B muestra que >98 % de la muestra consiste en IgG intacta, prácticamente sin formar agregados.

La espectrometría de masas se realizó como se describe en el Ejemplo 12. La Figura 9C muestra los perfiles de espectrometría de masas de los materiales de partida IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC. El producto en la muestra con brazos Fab intercambiados es de 145.901 kDa, que coincide perfectamente con el producto biespecífico derivado de IgG1-2F8-ITL (146.259,5/2 = 73.130) + IgG4-7D8-CPPC (145.542,0/2 = 72.771). Por otra parte, el producto del anticuerpo biespecífico mostró un pico homogéneo, lo que indica que no se produjo ningún emparejamiento erróneo en la cadena ligera, lo que habría dado como resultado picos subdivididos. Estos datos muestran que el intercambio de brazos Fab dio como resultado un 100 % de anticuerpo biespecífico. Los pequeños picos detectados además del pico principal (K0) del IgG4-7D8-CPPC y la muestra biespecífica pueden atribuirse a la presencia de una (K1) o dos (K2) lisinas C-terminales.

Estos datos muestran que se generó una muestra de anticuerpo biespecífico funcional al ~100 % mediante el

intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC.

Ejemplo 16: Descifrando los requisitos de las sustituciones T350I, K370T y F405L para la participación en el intercambio de brazos Fab de la IgG1 humana

Para identificar adicionalmente los determinantes en el dominio CH3 de IgG1 que son necesarios para que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab, se comparó la IgG1 que contiene la triple mutación T350I-K370T-F405L (ITL) con los mutantes dobles T350I-K370T (IT), T350I-F405L (IL) y K370T-F405L (TL). También se sometió a ensayo el mutante simple F405L (L). Se utilizó 2-MEA como reductor para inducir el intercambio de brazos Fab *in vitro* (50 µg de cada anticuerpo en 100 µl de PBS/2-MEA 25 mM durante 90 min a 37 °C). Para el anticuerpo F405L mutante simple, se usó anticuerpo sin purificar del sobrenadante de una transfección transitoria después del intercambio de tampón a PBS usando dispositivos centrífugos Amicon Ultra (30k, Millipore, N.º de cat. UFC803096). Para detener la reacción de reducción, el agente reductor 2-MEA se eliminó desalando las muestras usando columnas de centrifugación como se describe en el Ejemplo 11. La generación de anticuerpos biespecíficos se determinó mediante la unión biespecífica medida en un ELISA como se describe en el Ejemplo 7.

Se introdujeron mutaciones triple (ITL), dobles (IT, IL y TL) y simple (L) en IgG1-2F8. Estos mutantes se combinaron con IgG4-7D8, que contenía una bisagra CPSC (de tipo silvestre) o una bisagra estabilizada (IgG4-7D8-CPPC), para el intercambio de brazos Fab usando 2-MEA 25 mM durante 90 min a 37 °C. La Figura 10A-B muestra que los mutantes IgG1-2F8-IL y -TL mostraron un intercambio de brazos Fab al mismo nivel que el mutante triple ITL, independientemente de la IgG4-7D8 combinada (bisagra CPSC o CPPC). Por el contrario, no se encontró unión biespecífica para la combinación con el mutante IgG1-2F8-IT. La Figura 10C muestra que también el mutante IgG1-2F8-F405L mostró intercambio de brazos Fab, independientemente de la IgG4-7D8 combinada (bisagra CPSC o CPPC). Estos datos indican que la mutación F405L es suficiente para la participación de IgG1 humana en el intercambio de brazos Fab en las condiciones mencionadas anteriormente.

Ejemplo 17: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA a diferentes temperaturas

La capacidad de 2-MEA para inducir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio de brazos Fab entre dos anticuerpos diferentes, se sometió a ensayo a diferentes temperaturas. Las reacciones de intercambio de brazos Fab se iniciaron incubando 160 µg de IgG1-2F8-ITL humana con 160 µg de IgG4-7D8-CPPC en 320 µl de PBS/2-MEA 25 mM (concentración final de 0,5 mg/ml para cada anticuerpo) a 0 °C, 20 °C (TA) o 37 °C. De estas reacciones, se tomaron muestras de 20 µl en diferentes momentos (0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 y 240 min). Se añadieron 20 µl de PBS a cada muestra antes de eliminar el agente reductor 2-MEA desalando las muestras usando una placa de desalación de centrifugación Zeba de 96 pocillos (7k, N.º de cat. 89808 Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de anticuerpos totales se determinaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Países Bajos). Se usaron series de diluciones de las muestras de anticuerpos (concentración de anticuerpos total de 0 a 20 µg/ml en diluciones con factor de dilución 25) en un ELISA para medir la unión biespecífica como se describe en el Ejemplo 7.

La Figura 11 muestra que la generación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL humana e IgG4-7D8-CPPC resultó ser más eficiente a 37 °C, con unión biespecífica máxima alcanzada después de 45 min. A temperatura ambiente, la generación de anticuerpos biespecíficos fue más lenta, alcanzando la unión biespecífica máxima después de 240 min. A 0 °C, no se observó generación de unión biespecífica durante el curso temporal analizado.

Ejemplo 18: Análisis de diferentes agentes reductores por su capacidad para inducir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab *in vitro*

Se ha demostrado anteriormente que GSH 0,5 mM puede inducir el intercambio de brazos Fab *in vitro* entre IgG4 e IgG1-CPSC-ITL humanas, pero no entre IgG4 e IgG1-ITL humanas que contienen una bisagra estable (Figura 3). Además, se descubrió que 2-MEA era capaz de inducir el intercambio de brazos Fab entre anticuerpos con regiones bisagra estabilizadas, tales como IgG1-ITL x IgG4-CPPC (Figura 5). Para someter a ensayo si otras concentraciones de GSH o 2-MEA u otros agentes reductores son capaces de inducir intercambio de brazos Fab *in vitro* entre dos anticuerpos diferentes, se sometieron a ensayo series de concentraciones de 2-MEA, GSH y DTT (ditiotreititol). Por lo tanto, combinaciones de 10 µg de IgG1-2F8-ITL humana y 10 µg de IgG4-7D8-CPPC en 20 µl de PBS (concentración final de 0,5 mg/ml para cada anticuerpo) se incubaron a 37 °C con series de concentraciones de los diferentes agentes reductores (0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 12,5, 25,0 y 50,0 mM). Después de 90 min, se añadieron 20 µl de PBS a cada muestra y se eliminó el agente reductor desalando las muestras usando una placa de desalación de centrifugación como se describe en el Ejemplo 17. Las concentraciones de anticuerpos totales se determinaron como se describe en el Ejemplo 17. Se usaron series de diluciones de las muestras de anticuerpos (concentración de anticuerpos total de 0 a 20 µg/ml en diluciones con factor de dilución 3) en un ELISA para medir la unión biespecífica como se describe en el Ejemplo 7.

La Figura 12 confirma que 2-MEA induce una unión biespecífica máxima a una concentración de 2-MEA 25 mM. Se descubrió que DTT era muy eficaz en la generación de anticuerpos biespecíficos alcanzándose la unión biespecífica máxima a DTT 2,5 mM. Las concentraciones de GSH en el intervalo de 0-5 mM no fueron capaces de inducir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab entre los anticuerpos IgG1-ITL e IgG4-CPPC, que contienen ambos regiones bisagra estabilizadas. Concentraciones de GSH superiores (12,5-50 mM) dieron como resultado la formación de agregados de anticuerpos, como se determinó mediante SDS-PAGE no reductora (datos no mostrados). Por lo tanto, estas muestras se excluyeron del análisis. Estos datos muestran que la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab entre dos anticuerpos diferentes puede ser inducida por diferentes agentes reductores.

Ejemplo 19: Determinantes en la posición 409 de IgG1 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-ITL

2-MEA puede inducir el intercambio de brazos Fab entre IgG1-ITL humana e IgG4-CPPC, como se describe en el Ejemplo 11 (Figura 5). Los restos de la interfaz CH3 de IgG1 y IgG4 humanas difieren sólo en la posición 409: lisina (K) en IgG1 y arginina (R) en IgG4 (descrito en el Ejemplo 8, Figura 2). Por lo tanto, se sometió a ensayo si la sustitución de lisina en la posición 409 por arginina o cualquier otro aminoácido (K409X) podría permitir que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA con IgG1-ITL. Se incubaron combinaciones de 10 µg de IgG1-2F8-ITL humana y 10 µg de IgG1-7D8-K409X en 20 µl de PBS/2-MEA 25 mM (concentración final de 0,5 mg/ml para cada anticuerpo) durante 90 min a 37 °C. Los anticuerpos sin purificar de los sobrenadantes de las transfecciones transitorias se usaron después del intercambio de tampón a PBS usando dispositivos centrífugos Amicon Ultra (30k, Millipore, N.º de cat. UFC803096). Después de la reacción de intercambio de brazos Fab, se añadieron 20 µl de PBS a cada muestra y se eliminó el agente reductor desalando las muestras usando una placa de desalación de centrifugación como se describe en el Ejemplo 17. Se usaron series de diluciones de las muestras de anticuerpos (concentración de anticuerpos total de 0 a 20 µg/ml en diluciones con factor de dilución 3) en un ELISA para medir la unión biespecífica como se describe en el Ejemplo 7.

La Figura 13A muestra los resultados de la unión biespecífica tras el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG1-7D8-K409X. En la Figura 13B, el intercambio se presenta como una unión biespecífica con respecto a un lote purificado de anticuerpo biespecífico derivado de un intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC, que se fijó en el 100 %. Estos datos también se puntuaron como (-) intercambio de brazos Fab nulo, intercambio de brazos Fab (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto, como se presenta en la Tabla 1. No se encontró ningún intercambio de brazos Fab (-) cuando la posición 409 en IgG1-7D8 era K (= IgG1 de tipo silvestre), L o M. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era intermedio (+) cuando la posición 409 en IgG1-7D8 era F, I, N o Y, y alto (++) cuando la posición 409 en IgG1-7D8 era A, D, E, G, H, Q, R, S, T, V o W.

Tabla 1: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X se determinó mediante un ELISA sándwich. Intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio, (++) alto.

IgG1-7D8-K409X	Intercambio de brazos Fab x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

Ejemplo 20: La desglicosilación de anticuerpos no influye en la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

Las muestras de IgG4-7D8 e IgG4-7D8-CPPC se desglicosilaron incubando 200 µg de anticuerpo durante la noche a 37 °C con 0,005 U de N-glicanasa (N.º de cat. GKE-5006D; Prozyme) en 180 µl de PBS. Estas muestras se usaron directamente en una reacción de intercambio de brazos Fab. El intercambio de brazos Fab se realizó incubando 50 µg de cada anticuerpo en 100 µl de PBS/2-MEA 25 mM (concentración final de 0,5 mg/ml para cada anticuerpo) durante 90 min a 37 °C. El agente reductor 2-MEA se eliminó desalando las muestras usando columnas de centrifugación como se describe en el Ejemplo 11. Se usaron series de diluciones de las muestras de anticuerpos (concentración de anticuerpos total de 0 a 20 µg/ml en diluciones con factor de dilución 3) en un ELISA sándwich para medir la unión biespecífica como se describe en el Ejemplo 7.

El análisis por espectrometría de masas mostró que la reacción de desglicosilación dio como resultado un producto de anticuerpo 100 % desglicosilado (datos no mostrados). La Figura 14 muestra que el intercambio de brazos Fab que implican anticuerpos desglicosilados no difirió del intercambio de brazos Fab con los anticuerpos glicosilados correspondientes (IgG4-2F8 x IgG4-7D8-desglicosilado frente a IgG4-2F8 x IgG4-7D8 e IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC-desglicosilado frente a IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC). Estos datos indican que la desglicosilación no afectó a la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA.

Ejemplo 21: Cuantificación de la interacción CH3-CH3 no covalente

La fuerza de las interacciones en la interfaz CH3 debe ser de manera que sea posible que ambas cadenas pesadas de los anticuerpos progenitores se disocien en la reacción de intercambio de brazos Fab y que posteriormente se asocien en la reacción de heterodimerización. Por lo tanto, se analizó la correlación entre la capacidad para participar en el intercambio de brazos Fab y la fuerza de la interacción CH3-CH3 no covalente (constante de disociación, K_D). El intercambio de brazos Fab inducido por GSH se realizó como se describe en el Ejemplo 9 (GSH 0,5 mM a 37 °C) para las siguientes combinaciones de anticuerpos humanos:

IgG1-2F8 x IgG1-7D8
 IgG1-2F8-CPSC x IgG1-7D8-CPSC
 IgG1-2F8-CPSC-T350I x IgG1-CPSC-7D8-T350I
 IgG1-2F8-CPSC-K370T x IgG1-7D8-CPSC-K370T
 IgG1-2F8-CPSC-ITL x IgG1-7D8-CPSC-ITL
 IgG1-2F8-CPSC-K409R x IgG1-7D8-CPSC-K409R
 IgG4-2F8 x IgG4-7D8
 IgG4-2F8-R409K x IgG4-7D8-R409K
 IgG4-2F8-R409A x IgG4-7D8-R409A
 IgG4-2F8-R409L x IgG4-7D8-R409L
 IgG4-2F8-R409M x IgG4-7D8-R409M
 IgG4-2F8-R409T x IgG4-7D8-R409T
 IgG4-2F8-R409W x IgG4-7D8-R409W
 IgG4-2F8-F405A x IgG4-7D8-F405A
 IgG4-2F8-F405L x IgG4-7D8-F405L
 IgG4-2F8-Y349D x IgG4-7D8-Y349D
 IgG4-2F8-L351K x IgG4-7D8-L351K
 IgG4-2F8-E357T x IgG4-7D8-E357T
 IgG4-2F8-S364D x IgG4-7D8-S364D
 IgG4-2F8-K370Q x IgG4-7D8-K370Q
 IgG4-2F8-K370E x IgG4-7D8-K370E

La generación de anticuerpos biespecíficos se midió mediante la determinación de la unión biespecífica en un ELISA sándwich como se describe en el Ejemplo 7. Las Figuras 15A/B/C muestran los resultados de la unión biespecífica después de la reacción de intercambio de brazos Fab.

Para medir el efecto de las mutaciones CH3 mencionadas anteriormente sobre la fuerza de la interacción CH3-CH3, se fabricaron fragmentos compuestos únicamente por los dominios CH2-CH3. La falta de una región bisagra en estos fragmentos impidió la formación de enlaces disulfuro covalentes entre cadenas pesadas. Los fragmentos se analizaron mediante espectrometría de masas nativa. Se intercambió el tampón de las muestras a acetato de amonio 100 mM, pH 7, usando columnas de filtro de centrifugación de MWCO (corte de peso molecular, por sus siglas en inglés) de 10 kDa. Se cargaron alícuotas (~1 µl) de muestras diluidas en serie (20 µM - 25 nM; equivalente de monómero) en capilares de borosilicato chapados en oro para su análisis en un espectrómetro de masas LCT (Waters). La señal del monómero, M_s , se definió como el área de los picos de monómero como una fracción del área de todos los picos en el espectro ($M_s/(M_s+D_s)$) donde D_s = la señal del dímero). La concentración del monómero en equilibrio, $[M]_{eq}$, se definió como $M_s/[M]_0$ donde $[M]_0$ es la concentración de proteína global en términos de monómero. La concentración de dímero en el equilibrio, $[D]_{eq}$, se definió como $([M]_0-[M]_{eq})/2$. La K_D , después se extrajo del gradiente de un gráfico de $[D]_{eq}$ frente a $[M]_{eq}^2$. La K_D de las interacciones CH3-CH3 no covalentes se presenta en la Tabla 2.

Se analizó la correlación entre la capacidad para participar en el intercambio de brazos Fab y la fuerza de las interacciones CH3-CH3 no covalentes. Las Figuras 15D/E muestran el porcentaje de unión biespecífica después del intercambio de brazos Fab representado contra la K_D medida del fragmento CH2-CH3 correspondiente (Figura 15D para IgG1; Figura 15E para IgG4). Estos datos sugieren que en las condiciones sometidas a ensayo existe un intervalo

específico de valores de K_D aparente de la interacción CH3-CH3 que permite un intercambio de brazos Fab eficiente.

Tabla 2: La K_D de las interacciones CH3-CH3 no covalentes

Construcción de CH2-CH3	K_D (M)	factor de diferencia*
G1	$3,0 \times 10^{-9}$	1,0000
G1-T350I	$7,0 \times 10^{-9}$	0,4000
G1-K370T	$4,5 \times 10^{-8}$	0,0700
G1-ITL	$1,0 \times 10^{-6}$	0,0030
G1-K409R	$1,1 \times 10^{-7}$	0,0300
G4	$4,8 \times 10^{-8}$	1,0000
G4-R409K	$8,0 \times 10^{-9}$	6,0000
G4-R409A	$1,6 \times 10^{-7}$	0,3000
G4-R409L	$1,5 \times 10^{-8}$	3,2000
G4-R409M	$3,0 \times 10^{-9}$	16,0000
G4-R409T	$7,2 \times 10^{-7}$	0,0700
G4-R409W	$3,4 \times 10^{-5}$	0,0014
G4-F405A	$1,9 \times 10^{-5}$	0,0025
G4-F405L	$2,5 \times 10^{-5}$	0,0019
G4-L351K	$7,4 \times 10^{-7}$	0,0600
G4-E357T	$4,1 \times 10^{-5}$	0,0012
G4-S364D	$4,7 \times 10^{-8}$	1,0200
G4-K370Q	$1,1 \times 10^{-8}$	4,3000
G4-K370E	$2,0 \times 10^{-9}$	24,0000

* En comparación con los fragmentos CH2-CH3 correspondientes de IgG1 o IgG4 de tipo silvestre

5 Ejemplo 22: Análisis de diferentes reductancias para determinar su capacidad para inducir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R

Se descubrió que 2-MEA y DTT inducen el intercambio de brazos Fab *in vitro* entre IgG1-ITL humana e IgG4-CPPC (Figura 12). Se sometió a ensayo si estas reductancias también pueden inducir el intercambio de brazos Fab *in vitro* entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas. Se sometieron a ensayo series de concentraciones de 2-MEA, DTT, GSH y TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina). El intercambio de brazos Fab se realizó como se describe en el Ejemplo 18. Las series de concentraciones sometidas a ensayo de los diferentes agentes reductores fueron las siguientes: 2-MEA, GSH, DTT o TCEP 0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 5,0, 25,0, 50,0 mM.

La Figura 17 confirma que 2-MEA induce un intercambio máximo de brazos Fab a una concentración de 2-MEA 25 mM, que persistió a la concentración más alta de 2-MEA 50,0 mM. Se descubrió que DTT era muy eficaz en la generación de anticuerpos biespecíficos alcanzándose un intercambio máximo de brazos Fab a DDT 0,5 mM, que también persistió en concentraciones superiores de DTT (1,0-50,0 mM). También se descubrió que TCEP era muy eficaz en la generación de anticuerpos biespecíficos alcanzándose un intercambio máximo de brazos Fab a 0,5 mM. A una concentración $\geq 25,0$ mM, el intercambio de brazos Fab por TCEP se alteró. Las concentraciones de GSH en el intervalo de 0,0-5,0 mM no fueron capaces de inducir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab. Concentraciones superiores de GSH (25,0-50,0 mM) dieron como resultado la formación de agregados de anticuerpos (datos no mostrados). Por lo tanto, estas muestras se excluyeron del análisis. Estos datos muestran que la generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab entre dos anticuerpos diferentes puede ser inducida por diferentes agentes reductores.

Ejemplo 23: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R

Para confirmar la formación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas, se determinaron los pesos moleculares de las muestras de las reacciones de intercambio de brazos Fab con una serie de concentraciones de 2-MEA mediante EM-IEN. La serie de concentraciones sometida a ensayo fue la siguiente: 2-MEA 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 25,0 y 40,0 mM. El intercambio de brazos Fab (en PBS) y el ELISA sándwich se realizaron como se describe en el Ejemplo 11. La EM-IEN se realizó como se describe en el Ejemplo 12.

La Figura 18A muestra que 2-MEA indujo el intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R de manera dependiente de la dosis, conduciendo eficientemente a la generación de anticuerpos biespecíficos con un nivel máximo de unión biespecífica a una concentración de 2-MEA 15,0 mM. Los datos de EM-IEN cuantificados se presentan en la Figura 18 B y muestran que el intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R dio como resultado casi un 100 % de anticuerpos biespecíficos, confirmando los resultados del ELISA de unión biespecífica.

Ejemplo 24: Pureza del anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-

MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humanas

Un lote de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humanas, se purificó usando una columna de desalación PD-10 (N.º de cat. 17-0851-01; GE Healthcare). A continuación, la pureza del producto biespecífico se analizó mediante espectrometría de masas como se describe en el Ejemplo 12.

La Figura 19 muestra los perfiles de espectrometría de masas de los materiales de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. El producto en la muestra con brazos Fab intercambiados es de 146.160,7 kDa, que coincide con el producto biespecífico derivado de IgG1-2F8-F405L ($146.606,8/2 = 73.303,3$) IgG1-7D8-K409R ($146.312,2/2 = 73.156,1 = 146.459,4$). Por otra parte, el producto del anticuerpo biespecífico mostró un pico homogéneo, lo que indica que no se produjo ningún emparejamiento erróneo en la cadena ligera, lo que habría dado como resultado picos subdivididos. Estos datos muestran que el intercambio de brazos Fab dio como resultado aproximadamente un 100 % de anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 25: Análisis *in vivo* de la estabilidad y farmacocinética de anticuerpos biespecíficos generados a partir de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

El anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R se inyectó en ratones SCID para analizar su estabilidad (intercambio de brazos Fab *in vivo*) y propiedades farmacocinéticas como se describe en el Ejemplo 14. Se analizaron dos grupos de ratones (3 ratones por grupo): (1) 100 µg de anticuerpo biespecífico; (2) 100 µg de anticuerpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante (IgG4-637, descrita en el documento WO2007068255). Las concentraciones de IgG total en las muestras de plasma se sometieron a ensayo mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 14, con la excepción de que en este ejemplo, se usó anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (Jackson, N.º de cat. 109-035-098, 1/10.000) como conjugado para la detección. La presencia de anticuerpos biespecíficos en las muestras de plasma se analizó y cuantificó mediante la reactividad biespecífica de CD20 y EGFR en un ELISA sándwich como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 20A muestra las concentraciones plasmáticas totales de anticuerpos a lo largo del tiempo. La forma de las curvas de claramiento plasmático fue idéntica en ambos grupos. La Figura 20B muestra las concentraciones plasmáticas del anticuerpo biespecífico a lo largo del tiempo. La adición de un exceso de 10 veces de IgG4 irrelevante al anticuerpo biespecífico no afectó a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos, lo que indica que no se produjo ningún intercambio de brazos Fab *in vivo*. Estos datos indican que el producto de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R, era estable *in vivo* (sin intercambio de brazos Fab).

Ejemplo 26: Destrucción celular mediada por CDC mediante anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humanas

El anticuerpo contra CD20 IgG1-7D8 puede destruir eficazmente células que expresan CD20 mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por el contrario, el anticuerpo contra EGFR IgG1-2F8 no media la CDC en las células diana que expresan EGFR. Se evaluó si el mutante IgG1-7D8-K409R y el anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R aún eran capaces de inducir CDC en células que expresaban CD20. Se preincubaron 10^5 de células Daudi o Raji durante 15 minutos con una serie de concentraciones de anticuerpo en 80 µl de medio RPMI suplementado con BSA al 0,1 % en un agitador a temperatura ambiente. Se añadieron 20 µl de suero humano normal (NHS, por sus siglas en inglés) como fuente de complemento (concentración final de NHS del 20 %) y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 30 µl de medio RPMI enfriado con hielo suplementado con BSA al 0,1 % para detener la reacción de CDC. Las células muertas y viables se discriminaron añadiendo 10 µl de yoduro de propidio (PI) a 10 µg/ml (concentración final de 1 µg/ml) y análisis por FACS.

La Figura 21 muestra que la destrucción celular mediada por CDC de células Daudi (Figura 21A) y Raji (Figura 21B) que expresaban CD20 por IgG1-7D8 no se vio influenciada por la introducción de la mutación K409R. Tanto las células Daudi como las Raji no expresan EGFR, dando como resultado la unión monovalente del anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. No obstante, el anticuerpo biespecífico todavía indujo la destrucción celular mediada por CDC de las células que expresaban CD20. Estos datos indican que la capacidad de CDC de un anticuerpo progenitor se conservó en el formato biespecífico.

Ejemplo 27: Destrucción celular mediada por ADCC mediante el anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humanas

El anticuerpo EGFR IgG1-2F8 puede destruir células que expresan EGFR, tales como A431, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células A431 no expresan CD20 y, por lo tanto, el anticuerpo contra CD20 IgG1-7D8 no induce ADCC en estas células. Se sometió a ensayo si el mutante IgG1-2F8-F405L y el anticuerpo

biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R aún eran capaces de inducir ADCC en células A431. Para el aislamiento de células efectoras, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de sangre completa de un donante sano usando tubos Leucosep® (Greiner Bio-one, N.º de cat. 227290) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las células diana se marcaron añadiendo 100 µCi de ⁵¹Cr a 5x10⁶ células A431 en 1 ml de medio RPMI suplementado con BSA al 0,1 % e incubando durante 60 minutos en un baño de agua con agitación a 37 °C. Las células marcadas se lavaron y se resuspendieron en RPMI suplementado con BSA al 0,1 %. Se preincubaron 5x10⁴ células diana marcadas en RPMI suplementado con BSA al 0,1 % en 100 µl durante 15 min con la serie de concentraciones de anticuerpos (intervalo de concentración final de 0-10 µg/ml en el ensayo de ADCC en diluciones con factor de dilución 3) a temperatura ambiente. El ensayo de ADCC se inició añadiendo 50 µl de células efectoras (5x10⁶ células) en una relación E:T de 100:1. Después de 4 horas a 37 °C, se midió la liberación de ⁵¹Cr de experimentos por triplicado en un contador de centelleo como recuentos por minuto (rpm). El porcentaje de toxicidad celular se calculó usando la siguiente fórmula: porcentaje de lisis específica = (rpm experimental - rpm basal)/(rpm máximo - rpm basal) X 100. La liberación de ⁵¹Cr máxima se determinó añadiendo 50 µl de Triton X-100 al 5 % a 50 µl de células diana (5x10⁴ células), y la liberación basal se midió en ausencia de anticuerpos sensibilizantes y células efectoras.

La Figura 22 muestra que el anticuerpo específico de CD20 IgG1-7D8 no indujo ADCC en las células A431 negativas para CD20. Tanto IgG1-2F8 como el mutante IgG1-2F8-F405L fueron capaces de inducir ADCC en células A431, lo que indica que la introducción de la mutación F405L en IgG1-2F8 no afectó a su función efectora de ADCC. Además, el anticuerpo biespecífico derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R indujo ADCC en células A431 de manera dependiente de la dosis, lo que indica que la función efectora de ADCC se conservó en el formato biespecífico.

Ejemplo 28: Determinantes en la posición 405 de IgG1 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R

En el Ejemplo 16 se describe que la mutación F405L es suficiente para permitir que la IgG1 humana participe en el intercambio de brazos Fab cuando se combina con IgG4-7D8. Para someter a ensayo adicionalmente los determinantes en la posición IgG1 405 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R humana, todos los posibles mutantes IgG1-2F8-F405X (con excepción de C y P) se combinaron con IgG1-7D8-K409R. El procedimiento se realizó con anticuerpos purificados como se describe en el Ejemplo 19.

La Figura 23 muestra los resultados de la unión biespecífica tras el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405X x IgG1-7D8-K409R. Estos datos también se puntuaron como (-) intercambio de brazos Fab nulo, intercambio de brazos Fab (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto, como se presenta en la Tabla 3. No se encontró ningún intercambio de brazos Fab (-) cuando la posición 405 en IgG1-2F8 era F (= IgG1 de tipo silvestre). Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era bajo (+/-) cuando la posición 405 en IgG1-2F8 era G o R. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era alto (++) cuando la posición 405 en IgG1-2F8 era A, D, E, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W o Y. Estos datos indican que mutaciones particulares en la posición 405 de IgG1 permiten que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA cuando se combinan con IgG1-K409R.

Tabla 3: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R.

La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA sándwich. Intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio, (++) alto.

IgG1-2F8-F405X	Intercambio de brazos Fab x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

Ejemplo 29: Determinantes en la posición 407 de IgG1 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R

- 5 En el Ejemplo 28, se describe que determinadas mutaciones individuales en la posición F405 son suficientes para permitir que la IgG1 humana participe en el intercambio de brazos Fab cuando se combinan con IgG1-K409R. Para someter a ensayo si otros determinantes implicados en las posiciones de la interfaz Fc:Fc en el dominio CH3 también podrían mediar el mecanismo de intercambio de brazos Fab, se realizó mutagénesis de la posición 407 de IgG1 y se evaluó la participación de los mutantes en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R humana. Todos los posibles mutantes IgG1-2F8-Y407X (con excepción de C y P) se combinaron con IgG1-7D8-K409R. El procedimiento se realizó con anticuerpos purificados como se describe en el Ejemplo 19.

La Figura 24 muestra los resultados de la unión biespecífica tras el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-Y407X x IgG1-7D8-K409R. Estos datos también se puntuaron como (-) intercambio de brazos Fab nulo, intercambio de brazos Fab (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto, como se presenta en la Tabla 4. No se encontró ningún intercambio de brazos Fab (-) cuando la posición 407 en IgG1-2F8 era Y (= IgG1 de tipo silvestre), E, K, Q o R. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era bajo (+/-) cuando la posición 407 en IgG1-2F8 era D, F, I, S o T e intermedio (+) cuando la posición 407 en IgG1-2F8 era A, H, N o V, y alto (++) cuando la posición 407 en IgG1-2F8 era G, L, M o W. Estos datos indican que mutaciones individuales particulares en la posición 407 de IgG1 permiten que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA cuando se combinan con IgG1-K409R.

Tabla 4: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R

La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA sándwich. Intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio, (++) alto.

IgG1-2F8-Y407X	Intercambio de brazos Fab x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

Ejemplo 30: Cuantificación de la interacción CH3-CH3 no covalente en heterodímeros de IgG1

- 30 Se describe en el Ejemplo 21 que existe un intervalo específico en la fuerza de la interacción de los homodímeros CH3-CH3 que permite un intercambio de brazos Fab eficiente. La fuerza de las interacciones en la interfaz CH3 debe ser de manera que sea posible que ambas cadenas pesadas de los anticuerpos progenitores (homodímeros) se disocien en la reacción de intercambio de brazos Fab y que posteriormente se asocien en la reacción de heterodimerización. Para generar un heterodímero estable, la fuerza de la interacción heterodimérica debe ser mayor que la fuerza de la interacción homodimérica, de manera que favorezca la heterodimerización sobre la homodimerización. Para confirmar esto, se midió la fuerza de la interacción CH3-CH3 en los heterodímeros y se comparó con la fuerza en los homodímeros. La K_D de los fragmentos CH2-CH3 derivados de los homodímeros IgG1-K409R, IgG1-F405L e IgG1-ITL se midieron como se describe en el Ejemplo 21. Para la determinación de la K_D en heterodímeros, los fragmentos del dominio CH2-CH3 (G1-F405L y G1-ITL) se mezclaron con el fragmento de IgG1Δbisagra de IgG1-7D8-K409R, que contienen todos los dominios de anticuerpos excepto la bisagra. La falta de regiones bisagra en ambos fragmentos impidió los enlaces disulfuro covalentes entre cadenas pesadas. Los fragmentos se mezclaron y analizaron después de 24 horas mediante espectrometría de masas nativa como se describe en el Ejemplo 21. Los valores de K_D de las interacciones CH3-CH3 no covalentes en los fragmentos CH2-CH3 indicados o mezclas de fragmentos CH2-CH3 con IgG1Δbisagra se presentan en la Tabla 5. Estos datos sugieren que, en las condiciones sometidas a ensayo, la fuerza de la interacción heterodimérica es mayor (K_D inferior) que las

interacciones homodiméricas correspondientes.

Tabla 5

Construcción de CH2-CH3/(IgG1Δbisagra)	Interacción	K _D (M)
G1-F405L/G1-K409R	Heterodímero	1,2 x 10 ⁻⁸
G1-ITL/G1-K409R	Heterodímero	1,7 x 10 ⁻⁸
G1-K409R	Homodímero	1,1 x 10 ⁻⁷
G1-F405L	Homodímero	8,5 x 10 ⁻⁷
G1-ITL	Homodímero	1,2 x 10 ⁻⁶

5 Ejemplo 31: Análisis bioquímico de un anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

Un lote de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L humana x IgG1-7D8-K409R, se purificó en una columna de desalación PD-10 (N.º de cat. 17-0851-01; GE Healthcare). A continuación, la pureza del producto biespecífico se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC), espectrometría de masas, HPLC y cromatografía de intercambio catiónico (HPLC-CIEX), isoelectroenfoque capilar (cIEF).

La SDS-PAGE se realizó en condiciones no reductoras (Figura 25A) y reductoras (Figura 25B) como se describe en el Ejemplo 15. La Figura 25A muestra que la muestra de anticuerpos después del intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA consiste en IgG intacta, con una traza de medias moléculas (H1L1) detectables en el gel no reducido.

La HP-SEC se realizó como se describe en el Ejemplo 15. La Figura 26(B) y la Figura 26(A) muestran los perfiles de HP-SEC de los materiales de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. La mezcla (1:1) de ambos anticuerpos y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R se muestran en la Figura 26C y la Figura 26D, respectivamente. Además, la Figura 26D muestra que >99 % de la muestra consiste en IgG intacta prácticamente sin agregados formados.

La espectrometría de masas (EM-IEN) se realizó como se describe en el Ejemplo 12. La Figura 27(B) y la Figura 27(A) muestran los perfiles de espectrometría de masas de los materiales de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. La mezcla (1:1) de ambos anticuerpos y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R se muestran en la Figura 27C y la Figura 27D, respectivamente. El producto en la muestra con brazos Fab intercambiados inducido por 2-MEA es de 146.159,7 kDa, lo que coincide perfectamente con el producto biespecífico derivado de IgG1-2F8-F405L (146.289,0/2 = 73.145) x IgG1-7D8-K409R (146.028,0/2 = 73.014). Por otra parte, el producto del anticuerpo biespecífico mostró un pico homogéneo, lo que indica que no se produjo ningún emparejamiento erróneo en la cadena ligera, lo que habría dado como resultado picos subdivididos. Estos datos muestran que el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA dio como resultado IgG biespecífica. Los pequeños picos indicados con (*) fueron el resultado de una desglicosilación incompleta antes del análisis. Estos datos muestran que se generó una muestra de anticuerpo biespecífico mediante el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

El isoelectroenfoque capilar (cIEF) se realizó usando un analizador iCE280 (Convergent Biosciences). La Figura 28A y la Figura 28B muestran los perfiles de cIEF de los materiales de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. La mezcla (1:1) de ambos anticuerpos y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R se muestran en la Figura 28C y la Figura 28D, respectivamente. Todas las muestras se desalaron antes de su uso. Las concentraciones finales en la mezcla de ensayo fueron IgG 0,3 mg/ml (metilcelulosa al 0,35 %; anfolitos portadores 3-10 al 2 %; anfolitos portadores 8-10,5 al 6 %; marcador de pI 7,65 al 0,5 % y marcador pI al 0,5 % 10,10). El enfoque se realizó durante 7 min a 3000 V y la imagen de absorción de todo el capilar se capturó mediante una cámara de dispositivo acoplado a carga. Después de la calibración de los perfiles de pico, los datos se analizaron mediante el software EZChrom. Los marcadores de pI se indican con (*). Estos datos muestran que se generó una muestra de anticuerpo biespecífico mediante el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

Otra técnica para estudiar las isoformas cargadas de los anticuerpos monoclonales es la cromatografía de líquidos de alta presión e intercambio catiónico (HPLC-CIEX). La Figura 29A y la Figura 29B muestran los perfiles de HPLC-CIEX de los materiales de partida IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R, respectivamente. La mezcla (1:1) de ambos anticuerpos y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R se muestran en la Figura 29C y la Figura 29D, respectivamente. Las muestras se diluyeron a 1 mg/ml en la fase móvil A (NaPO₄ 10 mM, pH 7,0) para su inyección en la HPLC. Las moléculas de IgG con carga diferente se separaron usando un ProPac® WCX-10, 4 mm x 250 mm, columna analítica con un caudal de 1 ml/min. La elución se realizó con un gradiente de Fase móvil A a Fase móvil B (NaPO₄ 10 mM, pH 7,0, NaCl 0,25 M) y la detección se produjo a 280 nm. Estos datos muestran que se generó una muestra de anticuerpo biespecífico mediante el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. También demuestra que el intercambio catiónico es una herramienta potente para separar los homodímeros residuales del

heterodímero. Otra aplicación de la cromatografía de intercambio catiónico es, por lo tanto, el refinamiento de un heterodímero biespecífico, es decir, para purificar cualesquier homodímeros residuales después del intercambio.

Ejemplo 32: Expresión recombinante de heterodímeros mediante coexpresión simultánea de ambos homodímeros

Para ilustrar que la formación de heterodímeros también se produce cuando los dos homodímeros se coexpresan de forma recombinante, las células HEK-293F se cotransfectaron con los cuatro vectores de expresión (véase el Ejemplo 1) que codifican la cadena pesada y ligera de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405 en una relación de 1:1:1:1. Los anticuerpos se produjeron transitoriamente en condiciones sin suero como se describe en el Ejemplo 4. A continuación, la IgG se purificó mediante cromatografía de proteína A como se describe en el Ejemplo 5. La IgG purificada se desglicosiló y posteriormente se analizó mediante espectrometría de masas de ionización por electronebulización como se describe en el Ejemplo 12.

La masa teórica de la cadena pesada y ligera de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405 se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Masa teórica de la cadena pesada y ligera de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405

Homodímero	Cadena L (Da)	Cadena H (Da)
IgG1-2F8-F405	23252,8	49894,6
IgG1-7D8-K409R	23438,1	49579,0

Sobre la base de estas masas, teóricamente se podrían detectar las siguientes moléculas de IgG (Tabla 7). Las masas medidas (Figura 30) se indican en la columna final.

Tabla 7: Detección teórica de la cadena pesada y ligera de IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-F405

IgG1-2F8-F405		IgG1-7D8-K409R		Masa teórica (Da)	Masa medida (Da)
Cadena H	Cadena L	Cadena H	Cadena L		
2	2			146287	146284
		2	2	146026	146026
2			2	146657	146664
	2	2		145656	145660
2	1		1	146472	146477
	1	2	1	145841	145846
1	1	1	1	146157	146159
1	2	1		145971	145972
1		1	2	146342	146345

Los dos picos más abundantes de 146345 y 146159 Da representaron heterodímeros con una sola cadena ligera (de IgG1-7D8-K409R) o ambas cadenas ligeras incorporadas, respectivamente. Se detectaron homodímeros de ambas cadenas pesadas de IgG1-7D8-K409R o IgG1-2F8-F405, pero sólo en cantidades minoritarias. Estos datos muestran que la heterodimerización también se produce cuando se coexpresan los dos homodímeros.

Ejemplo 33: Control de la cinética del intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA y cuantificación de homodímeros residuales después del intercambio mediante el uso de HPLC-CIEX

La generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA se describe en el Ejemplo 11. En este ejemplo, la reacción de intercambio se controló mediante la realización de cromatografía de líquidos de alta presión e intercambio catiónico (HPLC-CIEX; como se describe en el Ejemplo 31) en diversos puntos temporales durante la reacción de intercambio.

Los homodímeros IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R se mezclaron en una relación molar de 1:1 a una concentración de 1 mg/ml cada uno. Después de la adición de 2-MEA 25 mM, la muestra se colocó en el muestreador automático de la HPLC, precalentado a 25 °C. La Figura 31A a 31H muestra ocho inyecciones consecutivas en diferentes intervalos de tiempo obtenidos mediante HPLC-CIEX que varían de $t = 0$ min a $t = 450$ min, respectivamente, después de la adición de 2-MEA. Los datos muestran que se formó IgG biespecífica con bastante rapidez y la mayor parte del homodímero se intercambió después de 135 min. Los picos heterogéneos del heterodímero que aparecieron después de 45 min se resolvieron en picos más homogéneos después de aproximadamente 180 min, lo que sugiere que el intercambio se produce en diferentes fases. Además, la Figura 32A muestra que se detectó aproximadamente el 3 % de homodímeros residuales con el método de CIEX (indicado por flechas). Como se muestra, este método es adecuado para cuantificar el contenido restante de homodímeros (la elución de los homodímeros se muestra en la Figura 32B) cuando la reacción de intercambio estaba casi completa).

Ejemplo 34: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-

MEA a concentraciones altas de anticuerpos a diversas concentraciones de 2-MEA, temperaturas y tiempos de incubación

El intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA se realizó a altas concentraciones de IgG. Se estudió la influencia de la concentración de 2-MEA, la temperatura de incubación y el tiempo en la cantidad de intercambio.

El proceso de intercambio se realizó usando la combinación de IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L. Ambos materiales se purificaron con cromatografía de afinidad usando proteína A. Después de la concentración del material a >20 mg/ml, se realizó una etapa de intercambio de aniones sucesivo (en modo de flujo continuo) usando HiPrep Q FF 16/10 (GE Health Care, N.º 28-9365-43). Se intercambió el tampón del material purificado final a PBS.

Se estudió el intercambio inespecífico a concentraciones finales de IgG de 20 mg/ml (cada homodímero a una concentración final de 10 mg/ml) y 10 mg/ml (cada homodímero a una concentración final de 5 mg/ml) en PBS. Se prepararon mezclas separadas para ambas concentraciones de IgG, incluyendo 2-MEA a concentraciones finales de 10, 25, 50 y 100 mM. Las mezclas se dividieron en alícuotas de 100 µl en tubos Eppendorf y se almacenaron a 15, 25 y 37 °C. Se usaron tubos separados para diferentes tiempos de incubación de 90 min, 5 horas y 24 horas a cada temperatura.

La mezcla también se preparó sin 2-MEA para ambas concentraciones de IgG y se almacenó a 4 °C como control sin tratar. Después de los tiempos de incubación adecuados, las muestras de 90 min y 5 horas se recogieron para desalar y eliminar el 2-MEA (las muestras de 90 minutos se colocaron inicialmente en hielo para detener la reacción de intercambio). Las muestras se desalaron usando una placa desalinizadora Zeba de 96 pocillos (7k, N.º de cat. 89808, Thermo Fisher Scientific). Las muestras de 24 horas se desalaron por separado después de 24 horas de incubación.

Se usaron diluciones en serie de las muestras de anticuerpos (concentración total de anticuerpos 10 - 0,123 µg/ml en diluciones con factor de dilución 3 para las muestras de 90 min y 5 horas; 10 - 0,041 µg/ml en diluciones con factor de dilución 3 para las muestras de 24 horas) en un ELISA sándwich para medir la unión inespecífica como se describe en el Ejemplo 7. Para cada placa, se incluyó un control de un lote purificado de anticuerpo inespecífico derivado de un intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC (como se describe en el Ejemplo 15). La Figura 34(A)-(F) muestra los resultados de la unión inespecífica medida en las placas de ELISA individuales. Los valores superiores de DO405 (determinados para las concentraciones de 10 µg/ml en el ELISA) se usaron para calcular la unión inespecífica en comparación con el control, que se fijó arbitrariamente en el 100 %. Esto dio como resultado el porcentaje de intercambio de brazos Fab controlado (% de cFAE, por sus siglas en inglés) en comparación con el control como se muestra en la Figura 34 (A)-(D) para cada concentración de 2-MEA.

Los datos muestran que el nivel máximo de unión inespecífica (89-109 % con respecto al control) se alcanzó a una concentración de 2-MEA 100 mM para ambas concentraciones de IgG en todas las condiciones de temperatura-tiempo. A 2-MEA 50 mM, la unión máxima (88-107 %) se alcanzó a 25 °C y 37 °C y también a 15 °C después de 24 horas de incubación. Para las concentraciones inferiores de 2-MEA 25 mM y 10 mM, el intercambio fue más eficiente a temperaturas superiores y aumentó con un tiempo de incubación prolongado, conduciendo a un intercambio máximo a 37 °C tras 24 horas de incubación a 2-MEA 25 mM. Ninguna de las condiciones sometidas a ensayo a 2-MEA 10 mM generó un producto 100 % inespecífico. El proceso de intercambio fue ligeramente más rápido a concentraciones de IgG de 10 mg/ml en comparación con IgG total 20 mg/ml.

Para confirmar que se formaron anticuerpos inespecíficos y estudiar los productos inespecíficos con más detalle, las muestras se analizaron con análisis por intercambio catiónico (HPLC-CIEX). El análisis por HPLC-CIEX se realizó como se describe en el Ejemplo 31 para las muestras con concentraciones de IgG de 20 mg/ml después de 5 horas y 24 horas de incubación y todas las concentraciones de 2-MEA.

Los cromatogramas de CIEX en la Figura 35(A)-(D) muestran que el mayor rendimiento de producto inespecífico se obtuvo a 2-MEA 50 y 100 mM, lo que confirma los resultados del ELISA inespecífico. Sin embargo, todavía se detectaron cantidades minoritarias de homodímero residual a 2-MEA 50 y 100 mM (2 - 3,5 % de cada homodímero para muestras incubadas a 25 °C y 37 °C). El intercambio a temperatura superior, tiempo de incubación más largo (24 horas) y concentración de 2-MEA creciente da como resultado la aparición de picos adicionales a 22-24 min en el perfil de CIEX.

Se obtuvieron cantidades mínimas de picos adicionales cuando el intercambio concluyó en 5 horas. Para identificar la naturaleza de estos picos, se realizó un análisis por SDS-PAGE y un análisis por HP-SEC. El HP-SEC mostró que la cantidad de agregados fue inferior al 1 % para todas las condiciones, lo que sugiere que los picos adicionales no representan agregados. Sin embargo, la SDS-PAGE no reducida indicó que los picos adicionales pueden representar un heterodímero que carece de una o dos cadenas ligeras. También se detectaron cantidades minoritarias de semimoléculas.

El experimento muestra que la reacción de intercambio tiene lugar a concentraciones de homodímero altas, lo que hace que el proceso sea atractivo para la escala comercial, y que el rendimiento del anticuerpo inespecífico depende de la concentración de 2-MEA, la temperatura y el tiempo de incubación.

Ejemplo 35: Determinantes en la posición 368 de IgG1 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R

5 Los Ejemplos 28 y 29 muestran que determinadas mutaciones individuales en la posición F405 e Y407 son suficientes para permitir que la IgG1 humana participe en el intercambio de brazos Fab cuando se combina con IgG1-K409R. Como se ilustra en este ejemplo, determinantes adicionales implicados en las posiciones de la interfaz Fc:Fc en el dominio CH3 también pueden mediar el mecanismo de intercambio de brazos Fab. Para este efecto, se realizó mutagénesis de la posición 368 de IgG1 y se evaluó la participación de los mutantes en el intercambio de brazos Fab
 10 inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R humana. Todos los posibles mutantes IgG1-2F8-L368X (con excepción de C y P) se combinaron con IgG1-7D8-K409R. El procedimiento se realizó con anticuerpos purificados como se describe en el Ejemplo 19.

15 La Figura 36 muestra los resultados de la unión biespecífica tras el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-L368X x IgG1-7D8-K409R. Estos datos también se puntuaron como (-) intercambio de brazos Fab nulo, intercambio de brazos Fab (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto, como se presenta en la Tabla 8. No se encontró ningún intercambio de brazos Fab (-) cuando la posición 368 en IgG1-2F8 era L (= IgG1 de tipo silvestre), F o M. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era bajo (+/-) cuando la posición 368 en IgG1-2F8 era Y. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era intermedio (+) cuando la posición 368 en IgG1-2F8 era K y alto (++) cuando la
 20 posición 368 en IgG1-2F8 era A, D, E, G, H, I, N, Q, R, S, T, V o W. Estos datos indican que mutaciones particulares en la posición 368 de IgG1 permiten que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA cuando se combinan con IgG1K409R.

Tabla 8: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-L368X e IgG1-7D8-K409R

25 La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-L368X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA sándwich. Intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto.

IgG1-2F8-L368X	Intercambio de brazos Fab Intercambio de brazos Fab x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++

Ejemplo 36: Determinantes en la posición 370 de IgG1 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R

Los Ejemplos 28, 29 y 35 muestran que determinadas mutaciones individuales en las posiciones F405, Y407 o L368 son suficientes para permitir que la IgG1 humana participe en el intercambio de brazos Fab cuando se combinan con
 35 IgG1-K409R. Como se ilustra en este ejemplo, determinantes adicionales implicados en las posiciones de la interfaz Fc:Fc en el dominio CH3 también pueden mediar el mecanismo de intercambio de brazos Fab. Para este efecto, se realizó mutagénesis de la posición 370 de IgG1 y se evaluó la participación de los mutantes en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R humana. Todos los posibles mutantes IgG1-2F8-K370X (con excepción de C y P) se combinaron con IgG1-7D8-K409R. El procedimiento se realizó con anticuerpos purificados como se describe en el Ejemplo 19.
 40

La Figura 37 muestra los resultados de la unión biespecífica tras el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-K370X x IgG1-7D8-K409R. Estos datos también se puntuaron como (-) intercambio de brazos Fab nulo, intercambio de brazos Fab (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto, como se presenta en la Tabla 9. No se encontró
 45 ningún intercambio de brazos Fab (-) cuando la posición 370 en IgG1-2F8 era K (= IgG1 de tipo silvestre), A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V o Y. Sólo la sustitución de K370 con W dio como resultado un intercambio intermedio de

brazos Fab (+). Estos datos indican que sólo una mutación en la posición 370 de IgG1 (K370W) permite que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA cuando se combina con IgG1-K409R.

Tabla 9: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-K370X e IgG1-7D8-K409R

5 La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-K370X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA sándwich. Intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto.

IgG1-2F8-K370X	Intercambio de brazos Fab x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

Ejemplo 37: Determinantes en la posición 399 de IgG1 para la participación en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R

10 Los Ejemplos 28, 29, 35 y 36 muestran que determinadas mutaciones individuales en las posiciones F405, Y407, L368 o K370 son suficientes para permitir que la IgG1 humana participe en el intercambio de brazos Fab cuando se combinan con IgG1-K409R. Como se ilustra en este ejemplo, determinantes adicionales implicados en las posiciones de la interfaz Fc:Fc en el dominio CH3 también pueden mediar el mecanismo de intercambio de brazos Fab. Para este efecto, se realizó mutagénesis de la posición 399 de IgG1 y se evaluó la participación de los mutantes en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA en combinación con IgG1-K409R humana. Todos los posibles mutantes IgG1-2F8-D399X (con excepción de C y P) se combinaron con IgG1-7D8-K409R. El procedimiento se realizó con anticuerpos purificados como se describe en el Ejemplo 19.

15 La Figura 38 muestra los resultados de la unión biespecífica tras el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-D399X x IgG1-7D8-K409R. Estos datos también se puntuaron como intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto, como se presenta en la Tabla 10. No se encontró ningún intercambio de brazos Fab (-) cuando la posición 399 en IgG1-2F8 era D (= IgG1 de tipo silvestre), E y Q. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era bajo (+/-) cuando la posición 399 en IgG1-2F8 era V, intermedio (+) cuando la posición 399 en IgG1-2F8 era G, I, L, M, N, S, T o W. Se descubrió que el intercambio de brazos Fab era alto (++) cuando la posición 399 en IgG1-2F8 era A, F, H, K, R o Y. Estos datos indican que mutaciones particulares en la posición 399 de IgG1 permiten que IgG1 participe en el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA cuando se combinan con IgG1-K409R.

Tabla 10: Intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-D399X e IgG1-7D8-K409R

20 La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio de brazos Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-D399X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA sándwich. Intercambio de brazos Fab (-) nulo, (+/-) bajo, (+) intermedio o (++) alto.

IgG1-2F8-D399X	Intercambio de brazos Fab x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++

(continuación)

IgG1-2F8-D399X	Intercambio de brazos Fab x IgG1-7D8-K409R
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

Ejemplo 38: Determinación del intervalo de condiciones en el que el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA ocurre de manera subóptima para discriminar entre mutantes de IgG1 altamente eficientes

El proceso de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA se produce eficientemente a 37 °C cuando se usa 2-MEA 25 mM. En estas condiciones, la mayoría de los mutantes de IgG1 permisivos (IgG1 con determinadas mutaciones individuales en las posiciones 368, 370, 399, 405 y 407 y/o 409 como se describe en los Ejemplos 19, 28, 29 y 35-37) muestran niveles altos de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA (80 % - 100 %). Para identificar las condiciones experimentales que permitan la discriminación entre los mutantes de IgG1 con la mayor eficiencia, se estudió el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA para cuatro combinaciones de mutantes diferentes (IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G, IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H e IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R) a lo largo del tiempo a 15 °C y 20 °C, respectivamente. Aparte de los cambios de temperatura, el período de tiempo y la dilución del anticuerpo (20, 2, 0,2 y 0,02 µg/ml) el procedimiento se realizó como se describe en el Ejemplo 19.

A 20 °C, el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA de las cuatro combinaciones de mutantes se produjo a velocidades diferentes en comparación con el intercambio máximo (control positivo). Después de 105 minutos de incubación, IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H alcanzó el nivel máximo de intercambio, mientras que IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G e IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R alcanzaron un máximo del 90 %, 85 % y 85 %, respectivamente, después de 200 min.

La incubación de las diferentes combinaciones de mutantes de IgG1 a 15 °C mostró diferencias mucho más prominentes en las velocidades de intercambio (mostradas en la Figura 39). Después de incubaciones de 60 y 105 min, y el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA, las diferencias entre las cuatro combinaciones de mutantes fueron extremas. El intercambio de brazos Fab después de 200 minutos de incubación mostró eficiencias del 100 % (IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H), el 85 % (IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G) o el 65 % (IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A) en comparación con el control positivo.

Ejemplo 39: Análisis de eficiencias del intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA de mutantes en condiciones subóptimas

El proceso de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA se produce eficientemente a 37 °C cuando se usa 2-MEA 25 mM. En estas condiciones, la mayoría de los mutantes de IgG1 permisivos (IgG1 con determinadas mutaciones individuales en las posiciones 368, 370, 399, 405 y 407 y/o 409 como se describe en los Ejemplos 19, 28, 29 y 35-37) muestran niveles altos de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA (80-100 %). En el Ejemplo 38 se describe que las diferencias en las eficiencias de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA son más pronunciadas después de la incubación en las denominadas condiciones subóptimas, en concreto a 15 °C durante 60 a 105 min. En total, se seleccionaron 24 mutantes de IgG1-2F8 en L368, D399, F405 e Y407 (véase la Tabla 11) que muestran >90 % de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA con IgG1-7D8-K409R (Ejemplo 28, 29 y 35-37) y se sometieron a análisis de intercambio de brazos Fab con IgG1-7D8-K409A, G, H o R (basándose en los resultados informados en el Ejemplo 19). Para categorizar estas combinaciones mutantes según sus eficiencias para generar anticuerpos biespecíficos, se realizó el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA a 15 °C durante 90 min (condiciones subóptimas). Se tomaron dos mutantes IgG1-2F8 Y407Q y D399Q que mostraron un intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA débil después de la incubación con IgG1-7D-K409R (Ejemplo 29 y 37) como controles negativos adicionales y se usaron para estudiar si la incubación con otro aminoácido en la posición K409 (G, H o W) conduce a un resultado diferente. Aparte de un cambio en la temperatura y cambios en la dilución de anticuerpos (20, 2, 0,2 y 0,02 µg/ml), el procedimiento se realizó como se describe en el Ejemplo 19.

La incubación de todas las diferentes combinaciones de mutantes de IgG1 (como se desprende claramente de la Tabla 11) a 15 °C durante 90 min mostró un intervalo de diferentes eficiencias de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA. El resultado de la unión biespecífica a una concentración de anticuerpos de 20 µg/ml, se muestra en la Tabla

11. Los resultados se categorizaron en 4 clases; eficiencia de unión biespecífica nula (-), baja (+/-) intermedia (+) y alta (++) como se especifica en la leyenda a continuación para la Tabla 11. A partir de estos resultados se desprende claramente que, en condiciones subóptimas, algunas combinaciones de mutaciones de aminoácidos en las moléculas de IgG1 serán favorables para el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA.

5

Tabla 11: Unión biespecífica (% con respecto al control positivo) entre mutantes de IgG1 permisivos (20 µg/ml) a 15 °C durante 90 min

Intercambio de brazos Fab	IgG1-7D8-K409A	IgG1-7D8-K409G	IgG1-7D8-K409R	IgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-L368A	33	33	25	37
IgG1-2F8-L368D	49	50	41	54
IgG1-2F8-L368E	32	38	37	42
IgG1-2F8-L368G	46	53	44	53
IgG1-2F8-L368H	26	25	21	29
IgG1-2F8-L368N	47	52	43	54
IgG1-2F8-L368R	55	64	52	91
IgG1-2F8-L368S	39	45	37	53
IgG1-2F8-L368T	42	51	39	56
IgG1-2F8-L368V	42	49	33	51
IgG1-2F8-L368W	56	56	41	60
IgG1-2F8-D399F	13	15	14	15
IgG1-2F8-D399H	12	14	10	19
IgG1-2F8-D399K	40	43	34	46
IgG1-2F8-D399R	47	45	38	52
IgG1-2F8-D399Q	0	0	0	0
IgG1-2F8-F405I	32	49	39	60
IgG1-2F8-F405K	29	48	47	40
IgG1-2F8-F405L	31	44	39	46
IgG1-2F8-F405S	34	51	45	39
IgG1-2F8-F405T	35	47	42	46
IgG1-2F8-F405V	36	46	37	43
IgG1-2F8-F405W	17	20	16	18
IgG1-2F8-Y407L	44	41	49	49
IgG1-2F8-Y407W	48	53	47	62
IgG1-2F8-Y407Q	4	9	1	44

Leyenda de la Tabla 11

Unión biespecífica nula (0-3 %) (-)

Unión biespecífica baja (4-39 %) (+/-) Unión biespecífica intermedia (40-69 %) (+)

Unión biespecífica alta (70-100 %) (++)

- 10 De las moléculas IgG1-2F8 mutadas sometidas a ensayo (Tabla 11), se seleccionaron seis para un segundo análisis para confirmar los resultados obtenidos anteriormente (Tabla 11). Se seleccionaron varios mutantes por su eficiencia de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA alta (IgG1-2F8-L368R) e intermedia (IgG1-2F8-L368W, IgG1-2F8-F405I, IgG1-2F8-F405L e IgG1-2F8-Y407W). También se analizó por segunda vez IgG1-2F8-Y407Q puesto que
- 15 mostró una inesperada reacción positiva de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA con IgG1-7D8-K409H. En general, estos resultados, presentados en la Figura 40, confirmaron el análisis primario (Tabla 11) y muestran que las reacciones de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA de moléculas IgG1-2F8 mutadas con IgG1-7D8-K409H mostraron la mayor eficiencia. Además, las reacciones de intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre moléculas de IgG1-2F8 mutadas con IgG1-7D8-K409R que se informan en los Ejemplos 28, 29 y 35-37 como negativas aún son de interés ya que promueven potencialmente el intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA de IgG1.

20

Ejemplo 40: Usando el formato biespecífico para eliminar la actividad agonista no deseada de los anticuerpos contra c-Met antagonistas convirtiéndolos en un formato monovalente, biespecífico

25

Varios anticuerpos bivalentes desarrollados para la terapia con anticuerpos monoclonales muestran una actividad agonista no deseable tras unirse a su diana. Este también es el caso de la mayoría de los anticuerpos a base de IgG1 que se dirigen al receptor de tirosina cinasa c-Met. Estos anticuerpos agonistas inducen la dimerización del receptor seguida de la activación de varias vías de señalización corriente abajo. Como resultado, se induce el crecimiento y la diferenciación de células (tumores). El uso de formatos de anticuerpos monovalentes puede evitar la inducción de la dimerización del receptor. La combinación de un brazo Fab de un anticuerpo anti-c-Met con un brazo Fab de un anticuerpo irrelevante da como resultado un anticuerpo biespecífico que es funcionalmente monovalente y, por lo

30

tanto, totalmente antagonista. En este caso se combinó un anticuerpo agonista parcial (IgG1-069) o completo (IgG1-058), con IgG1-b12 (descrito por primera vez en Burton DR, *et al.*, "Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody", *Science*. 11 de noviembre de 1994; 266(5187):1024-1027) en anticuerpos biespecíficos. Se consideró que IgG1-b12 era un anticuerpo no de unión irrelevante, puesto que se genera

contra una proteína vírica (HIV-gp120). Los anticuerpos anti-c-Met utilizados en este ejemplo son anticuerpos monoclonales totalmente humanos generados en ratones transgénicos. IgG1-058 e IgG1-069 se unen a diferentes epítopos en c-Met.

058:

VH 058	EVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSAASGFTFSDYYMYW VRQTPEKRLEWVATISDDGSYTYYPDSVKGRFTISR NAKNNLYLQMSSLSKSEDTAMYYCAREGLYYGSGSY YNQDYWGQGLTVTVSS
VL 058	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYR QKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQQFTSYPIQITFGQGRLEIK

069:

VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISW VRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTNYAQLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDY WGQGLTVTVSS
VL 069	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWF QHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIK

Fosforilación del receptor

Se generaron anticuerpos contra c-Met biespecíficos monovalentes mediante una reacción de intercambio de brazos Fab con IgG1-058-F405L o IgG1-069-F405L e IgG1-b12-K409R como se describe en el Ejemplo 23 usando 2-MEA 25 mM. Se evaluó el efecto del anticuerpo biespecífico sobre la fosforilación de c-Met. Tras la dimerización de dos receptores c-Met adyacentes por el ligando natural HGF o por anticuerpos bivalentes agonistas, se fosforilan de forma cruzada tres restos tirosina (posición 1230, 1234 y 1235) en el dominio intracelular de c-Met. Esto conduce a la fosforilación de varios otros aminoácidos en el dominio intracelular de c-Met y a la activación de varias cascadas de señalización. La dimerización y activación de c-Met puede controlarse usando anticuerpos específicos para el receptor fosforilado en estas posiciones, que actúa como una lectura del agonismo potencial de los anticuerpos anti-c-Met.

Se cultivaron células A549, CCL-185 obtenidas de ATCC, en medio DMEM que contenía suero hasta alcanzar una confluencia del 70 %. Las células se tripsinizaron, se lavaron y se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos a 1*10e6 células/pocillo en un medio de cultivo que contenía suero. Después de la incubación durante la noche, las células se trataron con HGF (R&D systems; cat. 294-HG) (50 ng/ml) o el panel de anticuerpos (30 µg/ml) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS helado y se lisaron con tampón de lisis (Cell Signaling; cat. 9803) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche; cat. 11836170001). Las muestras de lisado celular se almacenaron a -80 °C. La activación del receptor se determinó mediante la detección de la fosforilación de c-Met en transferencia Western usando anticuerpos específicos de c-Met fosforilado. Las proteínas presentes en el lisado celular se separaron en un gel SDS-PAGE al 4-12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente se tiñó con un anticuerpo específico de c-Met fosforilado (Y1234/1235) (Cell Signaling, cat. 3129). Como control para la carga de gel, se determinaron los niveles totales de β-actina y c-Met usando anticuerpos anti c-Met (Cell Signaling, N.º de Cat. 3127) y anti β-actina (Señalización celular, N.º de Cat. 4967). En la Figura 41 se muestran los resultados de las transferencias Western.

Los controles de medio de cultivo de tejidos y células tratadas con el formato monovalente UniBody® (Genmab, documentos WO2007059782 y WO2010063785) del anticuerpo 5D5 (Genentech; documento WO 96/38557) no mostró ninguna fosforilación del receptor c-Met. El formato UniBody monovalente como se usa en el presente documento es una IgG4, en donde la región bisagra se ha suprimido y en donde la región CH3 se ha mutado en las posiciones 405 y 407. Por el contrario, el análisis por transferencia Western de células tratadas con el HGF de control positivo o el anticuerpo agonista IgG1-058 mostró una banda clara a la altura esperada del c-Met fosforilado. El anticuerpo agonista parcial IgG1-069 mostró menos fosforilación del receptor, pero detectable, lo que indica que se produce algún tipo de entrecruzamiento del receptor. Sin embargo, tanto los anticuerpos biespecíficos IgG1 058/b12 como los biespecíficos 069/b12 no indujeron fosforilación de c-Met en absoluto, mostrando que la actividad agonista

asociada a los anticuerpos progenitores estaba totalmente ausente (Figura 41).

Efecto de los anticuerpos contra c-Met sobre la proliferación de NCI-H441 in vitro

5 Se sometió a ensayo la posible actividad agonista proliferativa de los anticuerpos contra c-Met *in vitro* en la estirpe celular de adenocarcinoma de pulmón NCI-H441 (ATCC, HTB-174™). Esta estirpe celular expresa niveles altos de c-Met, pero no produce su ligando HGF. Se sembraron células NCI-H441 en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) (5.000 células/pocillo) en RPMI (Lonza) sin suero. Se diluyó anticuerpo anti c-Met a 66,7 nM en medio RPMI sin suero y se añadió a las células. Después de siete días de incubación a 10 37 °C/CO₂ al 5 %, la cantidad de células viables se cuantificó con Alamarblue (BioSource International, San Francisco, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se controló usando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con configuración convencional de Alamarblue.

15 En contradicción con IgG1-069, no se indujo proliferación tras la incubación de células NCI-H441 con el biespecífico IgG1-069/b12, como se muestra en la Figura 42. Además, el control de UniBody-069 no indujo proliferación, lo que era comparable tratamiento con IgG1-b12 o nulo.

Ejemplo 41: Destrucción celular mediada por CDC mediante anticuerpos biespecíficos generados mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L o IgG1-7D8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas

20 El anticuerpo contra CD20 IgG1-7D8 puede destruir eficazmente células que expresan CD20 mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por el contrario, el anticuerpo contra EGFR IgG1-2F8 no media la CDC en las células diana que expresan EGFR. Tanto IgG1-7D8-K409R como el anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R son capaces de inducir 25 CDC en células que expresan CD20 (como se describe en el Ejemplo 26). Se evaluó si el anticuerpo biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L e IgG1-7D8-K409R también podría inducir CDC en células que expresan CD20. Se preincubaron 10⁵ de células Daudi o Raji durante 15 minutos con una serie de concentraciones de anticuerpo en 100 µl de medio RPMI suplementado con BSA al 0,1 % en un 30 agitador a temperatura ambiente. Se añadieron 25 µl de suero humano normal (NHS, por sus siglas en inglés) como fuente de complemento (concentración final de NHS del 20 %) y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Después de la incubación, la placa se colocó en hielo para detener la reacción de CDC. Las células muertas y viables se discriminaron añadiendo 10 µl de yoduro de propidio (PI) a 10 µg/ml (concentración final de 0,6 µg/ml) y análisis por FACS.

35 La Figura 43 muestra que IgG1-7D8 y el producto biespecífico generado mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-7D8-F405L e IgG1-7D8-K409R tienen la misma potencia para inducir la destrucción celular mediada por CDC de Daudi (Figura 43A) y Raji (Figura 43B) que expresan CD20. Tanto las células Daudi como las Raji no expresan EGFR, dando como resultado la unión monovalente del anticuerpo biespecífico generado mediante 40 intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Este producto biespecífico también indujo la destrucción celular mediada por CDC, aunque un poco menos eficiente. Estos datos indican que la capacidad de CDC de un anticuerpo progenitor se conservó en el formato biespecífico. La inducción de la destrucción celular mediada por CDC mediante el producto biespecífico bivalente (IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R) fue ligeramente más eficiente en comparación con el producto biespecífico monovalente (IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R). El anticuerpo 11B8 dirigido contra CD20 no es capaz de inducir la destrucción celular mediada por CDC y actúa como control negativo.

Ejemplo 42: Anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 sometidos a ensayo en un ensayo de destrucción de ETA' dirigido por kappa *in vitro*

50 El ejemplo muestra que los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 pueden suministrar un agente citotóxico a las células tumorales después de la internalización en un ensayo de destrucción celular genérico *in vitro* usando exotoxina A de *Pseudomonas* dirigida a kappa (anti-kappa-ETA'). Este ensayo usa un anticuerpo de dominio anti-kappa de alta afinidad conjugado con una forma troncada de la exotoxina A de *Pseudomonas*. Se han descrito anteriormente 55 proteínas de fusión similares de proteínas de unión de anticuerpos (motivo de unión de IgG de la proteína A o proteína G estreptocócica) y toxina diftérica o exotoxina A *Pseudomonas* (Mazor Y. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 2007; 321:41-59); Kuo SR. *et al.*, 2009 *Bioconjugate Chem.* 2009; 20:1975-1982). Estas moléculas, a diferencia de anti-kappa-ETA', se unen a la parte Fc de los anticuerpos completos. Tras la internalización y la clasificación endocítica, el anticuerpo de dominio anti-kappa-ETA' experimenta proteólisis y reducción del enlace disulfuro, separando el dominio catalítico del dominio de unión. Después, el dominio catalítico se transporta desde el Golgi al retículo endoplasmático a través de un motivo de retención KDEL y posteriormente se transloca al citosol, donde inhibe la síntesis de proteínas e induce la apoptosis (Kreitman RJ. *et al.*, *BioDrugs* 2009; 23:1-13).

65 Los anticuerpos anti-HER2 utilizados en este ejemplo y en los siguientes Ejemplos 43-45 son anticuerpos monoclonales totalmente humanos generados en ratones transgénicos. Se unen a diferentes epítopos en HER2.

Todos son anticuerpos IgG1, κ que se modifican en sus regiones Fc como se divulga adicionalmente. Tienen las siguientes secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera.

005:

5

VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWMGS IYPGDS DTRYRPSFQGGV TISADKSISTAYLQWTS LKASDTAIYYCARQRGD YYYFYGMDVWGQGTTTVTVSS
VL 005	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS- LTFGGG TKVEIK

025:

VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE IHHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDS GVYYFDYWAQGT LTVTVSS
VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA SSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQQYNSYPITFGQGTR LEIK

10 **153:**

VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHWVRQAPGKGLEWVTV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGI TGTGTFDYWGQGT LTVTVSS
VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDA SSLQSGVPSRFSGSGYGTDFSLTISLQPEDFAIYYCQQYKSYPTFGQGTRL EIK

169:

VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMG WLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDR IVVRPDYFDYWGQGT LTVTVSS
VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRNWPRTFGQGTK VEIK

15

Los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 se preincubaron con anti-kappa-ETA' antes de la incubación con células A431. Las células A431 expresan ~15.000 anticuerpos contra HER2 por célula (determinado mediante análisis Qifi) y no son sensibles al tratamiento con anticuerpos contra HER2 "desnudos".

20 En primer lugar, se determinó la concentración óptima de anti-kappa-ETA' para cada estirpe celular, es decir, la dosis máxima tolerada que no conduce a la inducción de muerte celular no específica. Se sembraron células A431 (2500 células/pocillo) en medio de cultivo celular normal en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Greiner bio-one) y se dejaron adherir durante al menos 4 horas. Estas células se incubaron con una serie de diluciones de anti-kappa-ETA', 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0 μ g/ml en medio de cultivo celular normal. Después de 3 días, la cantidad de células viables se cuantificó con Alamarblue (BioSource International, San Francisco, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se controló usando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con configuración convencional de Alamarblue. La concentración más alta de anti-kappa-ETA' que no destruyó las células por sí sola (1 μ g/ml para células A431) se usó para los siguientes experimentos.

30 A continuación, se sometió a ensayo el efecto de los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 y de los anticuerpos monoespecíficos de HER2 preincubados con anti-kappa-ETA' para determinar su capacidad para inducir destrucción celular. Se sembraron células A431 como se ha descrito anteriormente. Se realizó una dilución en serie de los

anticuerpos específicos de HER2 (anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos) y se preincubaron durante 30 min con la concentración predeterminada de anti-kappa-ETA' antes de añadirlos a las células. Después de 3 días de incubación a 37 °C, la cantidad de células viables se cuantificó como se ha descrito anteriormente. Se representó la señal de Alamarblue de las células tratadas con anti-kappa-ETA' preincubadas con los anticuerpos en comparación con las células tratadas sin tratamiento con anticuerpos. Los valores de CE_{50} y la muerte celular máxima se calcularon usando el software GraphPad Prism 5. Se usó estaurosporina (23,4 µg/ml) como control positivo para la destrucción celular. Se usó un anticuerpo de control de isotipo (IgG1/kappa; IgG1-3G8-QITL) como control negativo.

La Figura 44 muestra que todos los anticuerpos biespecíficos de HER2 anti-kappa-ETA' preincubados fueron capaces de destruir células A431 de manera dependiente de la dosis. Estos resultados demuestran que la mayoría de los anticuerpos biespecíficos de HER2 evaluados fueron más eficaces que el anticuerpo monoespecífico presente en la combinación en este ensayo anti-kappa-ETA'. Además, la eficacia de los anticuerpos biespecíficos 005X169, 025X169 y 153X169 demostró que la eficacia de un anticuerpo monoespecífico que carece de actividad en esta destrucción de EETA' dirigida por kappa *in vitro*, el anticuerpo 169 específico de HER2, puede aumentarse a través de una combinación biespecífica con otro anticuerpo específico de HER2.

Ejemplo 43: Modulación negativa del receptor HER2 mediante incubación con anticuerpos biespecíficos dirigidos a diferentes epítomos de HER2

Los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 pueden unirse a dos epítomos diferentes en dos receptores HER2 espacialmente diferentes. Esto puede permitir que otros anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 se unan a los epítomos restantes en estos receptores. Esto podría dar lugar a un entrecruzamiento de receptores multivalentes (en comparación con la dimerización inducida por anticuerpos monovalentes) y, en consecuencia, potenciar la modulación negativa del receptor. Para investigar si los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 inducen una mayor modulación negativa de HER2, se incubaron células AU565 con anticuerpos y anticuerpos biespecíficos durante tres días. Se determinaron los niveles totales de HER2 y los niveles de anticuerpos unidos a HER2.

Se sembraron células AU565 en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos (100.000 células/pocillo) en medio de cultivo celular normal y se cultivaron durante tres días a 37 °C en presencia de anticuerpo contra HER2 10 µg/ml o anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2. Tras el lavado con PBS, las células se lisaron incubándolas durante 30 min a temperatura ambiente con 25 µl de tampón de lisis Surefire (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). Los niveles de proteína total se cuantificaron usando el reactivo de ensayo de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante. Los niveles de proteína HER2 en los lisados se analizaron usando un ELISA sándwich específico para HER2. Se usó anticuerpo de dominio intracelular de conejo anti-HER2 humano (Cell Signaling) para capturar HER2 y se usó anticuerpo policlonal de cabra anti-HER2 humano biotinilado (R&D systems, Minneapolis, EE. UU.), seguido de estreptavidina-poli-HRP, para detectar HER2 unido. La reacción se visualizó usando ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (un comprimido de ABTS diluido en 50 ml de tampón de ABTS [Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos]) y se detuvo con ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Se midió la fluorescencia a 405 nm en un lector de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, EE. UU.) y la cantidad de HER2 se expresó como un porcentaje con respecto a células sin tratar.

Los resultados se muestran en la Figura 45, que demuestra que todos los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 sometidos a ensayo indujeron una modulación negativa de HER2 ≥ 40 %. De forma interesante, todos los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 demostraron una mayor modulación negativa de HER2 en comparación con sus homólogos monoespecíficos.

Ejemplo 44: Colocalización de anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 con el marcador lisosómico LAMP1 analizada mediante microscopía confocal

El ensayo de modulación negativa de HER2 descrito en el Ejemplo 43 indicó que los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 fueron capaces de aumentar la degradación lisosómica de HER2. Para confirmar estos hallazgos, se aplicó la tecnología de microscopía confocal. Se cultivaron células AU565 en cubreobjetos de vidrio (espesor de 1,5 micrómetros, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemania) en un medio de cultivo tisular convencional durante 3 días a 37 °C. Las células se preincubaron durante 1 hora con leupeptina (Sigma) para bloquear la actividad lisosómica, después de lo cual se añadieron anticuerpos monoespecíficos de HER2 10 µg/ml o anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2. Las células se incubaron durante 3 o 18 horas adicionales a 37 °C. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con formaldehído al 4 % (Klinipath). Los portaobjetos se lavaron con tampón de bloqueo (PBS complementado con saponina al 0,1 % [Roche] y BSA al 2 % [Roche]) y se incubaron durante 20 min con tampón de bloqueo que contenía NH_4Cl 20 mM para inactivar el formaldehído. Los portaobjetos se lavaron nuevamente con tampón de bloqueo y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con CD107a anti-humano de ratón (LAMP1) (BD Pharmingen) para tefir los lisosomas. Después del lavado con tampón de bloqueo, los portaobjetos se incubaron 30 min a temperatura ambiente con un cóctel de anticuerpos secundarios; IgG-Cy5 de cabra anti-ratón (Jackson) y IgG-FITC de cabra anti-humana (Jackson). Los portaobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se montaron durante la noche en portaobjetos de microscopio con 20 µl de medio de montaje (se disolvieron 6 gramos de glicerol [Sigma] y 2,4 gramos de Mowiol 4-88 [Omnilabo] en 6 ml de agua destilada a los que se les añadieron 12 ml de Tris 0,2 M [Sigma] pH 8,5 y se incubaron

durante 10 minutos a 50-60 °C. El medio de montaje se repartió en alícuotas y se almacenó a -20 °C). Los portaobjetos se fotografiaron con un microscopio confocal Leica SPE-II (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63x 1,32-0,6 y el software LAS-AF. Para permitir la cuantificación de las intensidades de píxeles superpuestos, se debe evitar la saturación de píxeles. Por lo tanto, la intensidad del láser de FITC se redujo al 10 %, la ganancia inteligente se estableció en 830 V y el desplazamiento inteligente se estableció en - 9,48 %. Mediante el uso de estos ajustes, los anticuerpos biespecíficos se visualizaron claramente sin saturación de píxeles, pero los anticuerpos monoespecíficos en ocasiones eran difíciles de detectar. Para comparar la colocación lisosómica entre anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos, estos ajustes se mantuvieron iguales para todas las diapositivas confocales analizadas.

Se analizaron imágenes de 12 bits para determinar la colocación usando el software MetaMorph® (versión Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, EE. UU.). Las imágenes de FITC y Cy5 se importaron como pilas y se restó el fondo. Se usaron ajustes umbral idénticos (establecidos manualmente) para todas las imágenes de FITC y todas las imágenes de Cy5. La colocación se representó como la intensidad de píxeles de FITC en la región de superposición (ROI, por sus siglas en inglés), donde la ROI se compone de todas las regiones positivas para Cy5. Para comparar diferentes portaobjetos teñidos con varios anticuerpos contra HER2 o anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2, las imágenes se normalizaron usando la intensidad de píxeles de Cy5. Se usó IgG-Cy5 de cabra anti-ratón para teñir el marcador lisosómico LAMP1 (CD107a). La intensidad de píxeles de LAMP1 no debería diferir entre diversos anticuerpos contra HER2 o los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 sometidos a ensayo (una célula tenía una intensidad de píxeles de Cy5 de aproximadamente 200.000).

Valores normalizados para la colocación de FITC y Cy5 = [(TPI-FITC x porcentaje de colocación de FITC-Cy5)/100] x [200,000/TPI-Cy5]

En esta fórmula, TPI significa Intensidad Total de Píxeles, por sus siglas en inglés.

presenta el porcentaje de células viables, medido mediante la intensidad de píxeles de FITC superpuesta con Cy5 para diversos anticuerpos monoespecíficos de HER2 y anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2. Para cada anticuerpo o molécula biespecífica representada, se analizaron tres imágenes diferentes de un portaobjetos que contenía ~ 1, 3 o >5 células. Se observó una variación significativa entre las diferentes imágenes en cada portaobjetos. Sin embargo, fue evidente que todos los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 demuestran una mayor colocación con el marcador lisosómico LAMP1, en comparación con sus homólogos monoespecíficos. Estos resultados indican que una vez internalizados, los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 se clasifican de manera eficiente hacia los compartimentos lisosómicos, haciéndolos adecuados para un enfoque de conjugado anticuerpo-fármaco biespecífico.

Ejemplo 45: Inhibición de la proliferación de células AU565 tras la incubación con anticuerpos monoespecíficos de HER2 o biespecíficos de HER2 x HER2

Se sometieron a ensayo anticuerpos biespecíficos de HER2 para determinar su capacidad para inhibir la proliferación de células AU565 *in vitro*. Debido a los niveles altos de expresión de HER2 en las células AU565 (~1.000.000 copias por célula determinadas con Qifi-kit), HER2 es constitutivamente activo en estas células y, por lo tanto, no depende de la heterodimerización inducida por ligando. En una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), se sembraron 9.000 células AU565 por pocillo en presencia de anticuerpo contra HER2 o anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 10 µg/ml en medio de cultivo celular sin suero. Como control, se sembraron células en medio sin suero, sin anticuerpos ni anticuerpos biespecíficos. Después de tres días, la cantidad de células viables se cuantificó con Alamarblue (BioSource International, San Francisco, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se controló usando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con configuración convencional de Alamarblue. La señal de Alamarblue de las células tratadas con anticuerpos se representó como un porcentaje con respecto a las células sin tratar.

La Figura 47 representa la intensidad fluorescente de Alamarblue de las células AU565 después de la incubación con anticuerpos contra HER2 y anticuerpos biespecíficos de HER2XHER2. Se incluyó Herceptin® (trastuzumab) como control positivo y demostró inhibición de la proliferación como describe Juntilla TT. *et al.*, *Cancer Cell* 2009; 15: 429-440. Todos los anticuerpos biespecíficos de HER2 x HER2 fueron capaces de inhibir la proliferación de células AU565. Anticuerpos biespecíficos: IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R e IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R fueron más eficaces en comparación con sus homólogos de anticuerpos monoespecíficos en este ensayo.

Ejemplo 46: Análisis *in vitro* e *in vivo* de la unión de FcRn mediante anticuerpos IgG1 biespecíficos y anticuerpos IgG1 biespecíficos con bisagra suprimida que contienen uno o dos sitios de unión a FcRn en la región Fc.

El presente ejemplo ilustra la generación de moléculas biespecíficas asimétricas, es decir, moléculas con diferentes características en cada brazo Fab de acuerdo con la invención.

El receptor de Fc neonatal (FcRn) es responsable de la semivida plasmática prolongada de las IgG al proteger las IgG

de la degradación. Después de la internalización del anticuerpo, el FcRn se une a las regiones Fc de los anticuerpos en endosomas, donde la interacción es estable en un entorno ligeramente ácido (pH 6,0). Tras el reciclaje a la membrana plasmática, donde el entorno es neutro (pH 7,4), la interacción se pierde y el anticuerpo se libera de nuevo en la circulación. La región Fc de un anticuerpo contiene 2 sitios de unión de FcRn, uno en cada cadena pesada en las interfaces CH2-CH3. Una mutación H435A en la región Fc del anticuerpo anula la unión a FcRn (Shields, R.L., *et al.*, *J Biol Chem*, 2001, Firan, M., *et al.*, *Int Immunol*, 2001) y también se cree que la región bisagra influye en la unión de FcRn (Kim, J.K., *et al.*, *Mol Immunol.*, 1995). Además, se ha sugerido que la unión de anticuerpos bivalentes sobre monovalentes a FcRn desempeña una función en el reciclaje eficiente (Kim, J.K., *et al.*, *Scand J Immunol.*, 1994).

En este ejemplo se evalúa la influencia de la valencia de unión a FcRn mediante moléculas de IgG1 biespecíficas asimétricas, que contienen un único sitio de unión a FcRn. La contribución adicional de la región bisagra se evalúa mediante moléculas de IgG1 asimétricas biespecíficas con bisagra suprimida (Uni-G1).

La unión a FcRn de moléculas de IgG1 biespecíficas o de moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1) que no contenían, contenían 1 o contenían 2 sitios de unión a FcRn se midió mediante ELISA de FcRn humano y de ratón. Se produjeron moléculas monoespecíficas de anticuerpos IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R e IgG1-7D8-K409R-H435A como se describe en los ejemplos 2, 3, 4 y 5. Se produjeron moléculas monoespecíficas de IgG1 con bisagra suprimida Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-K409R y Uni-G1-7D8-K409R-H435A como se describe en el ejemplo 11. Se generaron moléculas de IgG1 biespecíficas mediante intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA entre moléculas IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409R o IgG1-7D8-K409R-H435A. Se produjeron moléculas de IgG1 con bisagra suprimida biespecíficas mediante incubación de Uni-G1-2F8-ITL con Uni-G1-7D8-K409R o Uni-G1-7D8-K409R-H435A. Se añadió una serie de diluciones con factor de dilución 3 de moléculas de IgG1 monoespecíficas y biespecíficas y moléculas de IgG1 con bisagra suprimida a FcRn humano o de ratón biotinilado capturado en una placa de ELISA recubierta con estreptavidina, seguido de una incubación a pH 6,0 y 7,4 durante 1 hora. Los anticuerpos unidos y las moléculas de IgG1 con bisagra suprimida se visualizaron usando anticuerpo de cabra antihumano marcado con peroxidasa de rábano picante (Fab')₂ como conjugado y ABTS como sustrato. Los resultados se midieron como densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm usando el lector EL808-Elisa.

La Figura 48 muestra los resultados de unión de los anticuerpos IgG1 monovalentes o bivalentes y moléculas de IgG1 con bisagra suprimida a FcRn humano (A) y FcRn de ratón (B) a pH 6,0 y pH 7,4. Como se esperaba, todos los anticuerpos sometidos a ensayo, ambas moléculas de IgG1 (biespecíficas) y de IgG1 con bisagra suprimida, no se unen eficientemente a FcRn (tanto humano como de ratón) a pH 7,4. En condiciones ligeramente ácidas (pH 6,0), la IgG1-2F8-ITL monoespecífica y la IgG1 biespecífica generada a partir de IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409R muestran eficiencias de unión bivalente a FcRn, aunque para el FcRn de ratón es 3 veces mayor en comparación con el humano, que imita el control positivo (IgG1-2F8) para la unión a FcRn. Esto indica que la mutación ITL y K409R no alteran la unión a FcRn.

Puede observarse un efecto claro de 2 frente a 1 frente a 0 sitios de interacción de FcRn cuando se compara la unión de las moléculas de IgG1 a FcRn humano y de ratón a pH 6,0 (Figura XXA y B, pH6, panel izquierdo). IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R e IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R (2 sitios de unión a FcRn) se unen de forma comparable al control (IgG1-2F8). Las moléculas con 0 sitios de unión a FcRn, IgG1-7D8-K409R-H435A no muestra ninguna unión. Las moléculas con 1 sitio de unión a FcRn, IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R-H435A, muestran una unión intermedia en comparación con las moléculas con 2 sitios de unión a FcRn.

La Figura 48 (A), pH 6,0, panel derecho muestra la unión a FcRn humano de moléculas de IgG1 con bisagra suprimida (Uni-G1). Todas las moléculas con bisagra suprimida tienen una interacción alterada con FcRn humano en comparación con las moléculas de IgG1 de control (IgG1-2F8), lo que indica que la bisagra de hecho influye en la interacción con FcRn cuando se evalúa en un ELISA de unión a FcRn. No puede observarse ningún efecto claro de los sitios de interacción de FcRn 2 frente a 1 frente a 0 cuando se compara la unión a FcRn humano a pH 6,0 de estas moléculas con bisagra suprimida.

Sin embargo, puesto que la unión de la IgG humana a FcRn de ratón es más fuerte, puede observarse un efecto claro de 2 frente a 1 frente a 0 sitios de interacción de FcRn cuando se compara la unión de estas moléculas de IgG con bisagra suprimida con FcRn de ratón a pH 6,0 (Figura 48 (B), pH 6,0, panel derecho). La unión de Uni-G1-7D8-K409R-H435A/Uni-G1-2F8-ITL (1 sitio de unión a FcRn) es intermedia en comparación con la unión de Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-K409R y Uni-G1-2F8-ITL/Uni-G1-7D8-K409R (2 sitios de unión a FcRn) y Uni-G1-2F8-ITL-H435A (0 sitios de unión a FcRn, sin unión).

Ejemplo 47: Anticuerpos biespecíficos de Her2 x CD3 sometidos a ensayo en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*

CD3 es un correceptor en el complejo receptor de linfocitos T expresado en linfocitos T maduros. La combinación de un brazo Fab de anticuerpo específico de CD3 con un brazo Fab de anticuerpo específico de antígeno tumoral en un anticuerpo biespecífico daría como resultado el direccionamiento específico de los linfocitos T a las células tumorales, conduciendo a la lisis de células tumorales mediada por linfocitos T. Análogamente, los linfocitos T CD3 positivos podrían dirigirse a otras células alteradas en el cuerpo, a células infectadas o directamente a patógenos.

Se generaron anticuerpos biespecíficos de Her2 x CD3. Las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera para el brazo Fab específico de Her2 fueron las indicadas para los anticuerpos 153 y 169 en el Ejemplo 42. Se usaron las siguientes secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera para el brazo Fab específico de CD3:

5 **YTH12.5** (Secuencia descrita por Routledge *et al.*, *Eur J Immunol.* 1991, 21(11):2717-25.)

VH YTH12.5	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTI STSGGRYYRDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQY SGGFDYWGGQGLTVTVSS
VL YTH12.5	DIQLTQPN SVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDD DKRPDGV PDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGG TKLTVL

huCLB-T3/4 (Secuencia descrita por Parren *et al.*, *Res Immunol.* 1991, 142(9):749-63. Se introdujeron sustituciones de aminoácidos minoritarias para que la secuencia se pareciera a la estirpe germinal humana más próxima).

10

VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAT ISRYRYIYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLY GSSPDYWGGQGLTVTVSS
VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYDTSK LASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCFQGGSGYPLTFGSGTKLEM R

Todos los anticuerpos se expresaron como IgG1, κ y se modificaron en sus regiones Fc como se describe a continuación: IgG1-Her2-153-K409R e IgG1-Her2-153-N297Q-K409R, IgG1-Her2-169-K409R, IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L e IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L e IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L.

15

Los anticuerpos biespecíficos de estos anticuerpos específicos de Her2 y CD3 se generaron como se describe en el Ejemplo 11 y se sometieron a ensayo en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando células AU565.

20

Las células AU565 se cultivaron hasta casi la confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron durante 5 minutos a 37 °C. Se añadieron 12 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina y las células se centrifugaron durante 5 min, 800 rpm. Las células se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo y se preparó una suspensión de células individuales haciéndolas pasar a través de un tamiz de células. Se añadieron 100 μ l de 5×10^5 células/ml de suspensión a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y las células se incubaron al menos 3 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir la adherencia a la placa.

25

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre de voluntarios sanos usando tubos Leucosep de 30 ml, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Greiner Bio-one). Se aislaron linfocitos T de preparaciones de PBMC mediante selección negativa usando el kit Untouched Human T-cells Dynabead (Dyna). Las células aisladas se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración final de 7×10^6 células/ml.

30

Se eliminó el medio de cultivo de las células AU565 adheridas y se reemplazó con 50 μ l/pocillo de dilución de anticuerpo concentrado 2x y 50 μ l/pocillo de 7×10^6 linfocitos T/ml (relación efector:diana = 7:1). Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se eliminaron los sobrenadantes y las placas se lavaron dos veces con PBS. A cada pocillo se le añadieron 150 μ l de medio de cultivo y 15 μ l de azul de Alamar. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y se midió la absorbancia (Envision, Perkin Elmer).

35

La Figura 49 muestra que, mientras que los anticuerpos de control (IgG1 monoespecífica de Her2-Herceptin, IgG1 monoespecífica de CD3-YTH12.5 e IgG1 monoespecífica-huCLB-T3/4, anticuerpos monoespecíficos de antígeno irrelevante IgG1-b12 y anticuerpos biespecíficos CD3 x b12) no indujeron citotoxicidad mediada por linfocitos T, los anticuerpos Her2 x CD3 (Duo) biespecíficos huCLB/Her2-153, huCLB/Her2-169, YTH12.5/Her2-153 y YTH12.5/Her2-169 indujeron citotoxicidad dependiente de la dosis mediada por linfocitos T en células AU565. Los anticuerpos biespecíficos que contenían Her2-169 fueron más potentes que los que contenían Her2-153.

40

Se fabricaron mutantes de IgG1-hu-CLB-T3/4, IgG1-YTH12.5 y Her2-153 que contenían una mutación N297Q para eliminar un sitio de glicosilación; la glicosilación en este sitio es fundamental para las interacciones del IgG-receptor de Fc γ (Bolt S *et al.*, *Eur J Immunol* 1993, 23:403-411). La Figura 49 muestra que la mutación N297Q y, por lo tanto, la ausencia de glicosilación de Fc de los anticuerpos biespecíficos Her2 x CD3 YTH12.5/Her2-153 y huCLB/Her2-153 no repercutieron en el potencial de inducir citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis de células AU565.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para generar un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- 5 a) proporcionar un primer anticuerpo monoespecífico homodimérico que comprende una región Fc de inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3, en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,
- 10 b) proporcionar un segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico que comprende una región Fc de inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3, en donde dicho segundo anticuerpo monoespecífico comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,
- 15 c) incubar dicho primer anticuerpo monoespecífico junto con dicho segundo anticuerpo monoespecífico en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las secuencias Cys-Pro-Pro-Cys de la regiones bisagra centrales experimenten isomerización de enlaces disulfuro, y
- 20 d) obtener dicho anticuerpo biespecífico;

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico se une a un primer epítipo y dichos segundos anticuerpos monoespecíficos se unen a un segundo epítipo, en donde dichos epítipos primero y segundo son diferentes.

2. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región Fc del primer anticuerpo monoespecífico es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en donde la región Fc del segundo anticuerpo monoespecífico es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.

3. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las regiones Fc de ambos de dichos anticuerpos monoespecíficos primero y segundo son del isotipo IgG1.

4. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la interacción heterodimérica en el anticuerpo biespecífico resultante es

- a) de manera que no pueda producirse ningún intercambio de brazos Fab a 0,5 mM de glutatión en las condiciones descritas en el Ejemplo 13, y/o
- 40 b) de manera que no se produzca ningún intercambio de brazos Fab *in vivo* en ratones en las condiciones descritas en el Ejemplo 14, y/o
- c) más de dos veces más fuerte, tal como más de tres veces más fuerte, por ejemplo, más de cinco veces más fuerte que la más fuerte de las dos interacciones homodiméricas, por ejemplo, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 30.

5. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son de manera que

- 50 a) la constante de disociación de los heterodímeros del anticuerpo biespecífico resultante es inferior a 0,05 micromolar cuando se somete a ensayo como se describe en el Ejemplo 30, y/o
- b) las constantes de disociación de ambos homodímeros de los anticuerpos monoespecíficos primero y segundo son superiores a 0,01 micromolar, tal como superiores a 0,05 micromolar, preferentemente entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, incluso más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 micromolar cuando se someten a ensayo como se describe en el Ejemplo 21.

6. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho primer anticuerpo monoespecífico homodimérico no tiene más de una sustitución de aminoácido en la región CH3 y el segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico no tiene más de una sustitución de aminoácido en la región CH3 con respecto a las regiones CH3 de tipo silvestre.

7. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ I D NO: 1.

8. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo, excepto por cualquier mutación especificada, son anticuerpos humanos o humanizados.
9. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde ambos de dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo comprenden además una cadena ligera.
10. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho primer y/o segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn.
11. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichos anticuerpos monoespecíficos homodiméricos primero y segundo proporcionados en la etapa a) y b) se purifican.
12. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho primer y/o segundo anticuerpo monoespecífico homodimérico se conjuga con un fármaco, un profármaco o una toxina o contiene un grupo aceptor para el mismo.
13. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 en donde dicho primer y/o segundo epítipo se ubica en una célula tumoral;
 en donde dicho primer o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral y el otro epítipo se ubica en una célula efectora;
 en donde dicho primer o segundo epítipo se ubica en un linfocito T, tal como en CD3 expresado en un linfocito T;
 en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítipos en la misma célula tumoral;
 o
 en donde el primer anticuerpo se une a un epítipo en una célula tumoral, y el otro anticuerpo es un anticuerpo irrelevante o inactivo sin ninguna actividad de unión *in vivo* relevante para la aplicación prevista.
14. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las condiciones reductoras en la etapa c) comprenden la adición de un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina o derivados químicos de los mismos, ditiotreitól, glutatión, L-cisteína y beta-mercapto-etanol.
15. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa c) se realiza en condiciones reductoras con un potencial redox entre -150 y -600 mV, tal como entre -250 y -400 mV.
16. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa c) comprende la incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de 2-mercaptoetilamina al menos 25 mM o en presencia de ditiotreitól al menos 0,5 mM.
17. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa d) comprende la eliminación de un agente reductor, por ejemplo, mediante desalación.
18. Un método para la selección de un anticuerpo biespecífico que tiene una propiedad deseada, comprendiendo dicho método las etapas de:
- proporcionar un primer conjunto de anticuerpos homodiméricos que comprende anticuerpos con regiones variables diferentes y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, en donde dichos anticuerpos de dicho primer conjunto comprenden primeras regiones CH3 idénticas, en donde dichas regiones CH3 comprenden una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU),
 - proporcionar un segundo conjunto de anticuerpos homodiméricos que comprende anticuerpos con regiones variables diferentes o regiones variables idénticas y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, en donde dichos anticuerpos de dicho segundo conjunto comprenden segundas regiones CH3 idénticas, en donde dichas regiones CH3 comprenden una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU,
 - incubar combinaciones de anticuerpos de dicho primer conjunto y de dicho segundo conjunto en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las regiones bisagra experimenten isomerización de enlace disulfuro, generando de este modo un conjunto de anticuerpos biespecíficos,
 - restablecer opcionalmente las condiciones a no reductoras,
 - someter a ensayo el conjunto resultante de anticuerpos biespecíficos para una propiedad deseada dada, y

- f) seleccionar un anticuerpo biespecífico que tenga la propiedad deseada;

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dichos anticuerpos homodiméricos primero y segundo se unen a diferentes epítomos.

19. Un método para producir un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- a) proporcionar una primera construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una primera cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo que comprende una primera región CH3 que comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU y que comprende además una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,
- b) proporcionar una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una segunda cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo que comprende una segunda región CH3 que comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU y que comprende además una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central,
- c) coexpresar dichas construcciones de ácido nucleico primera y segunda en una célula hospedadora, y
- d) obtener dicho anticuerpo biespecífico a partir del cultivo celular;

en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y en donde dicha primera cadena pesada de longitud completa se une a un primer epítomo y dicha segunda cadena pesada de longitud completa se une a un segundo epítomo, en donde dichos epítomos primero y segundo son diferentes.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende además las características de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.

21. Un vector de expresión que comprende las construcciones de ácido nucleico especificadas en una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20.

22. Una célula hospedadora que comprende las construcciones de ácido nucleico especificadas en una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20.

23. Un anticuerpo biespecífico obtenido u obtenible mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, 19 o 20.

24. Un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido que comprende una primera cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que comprende una primera región Fc que comprende una primera región CH3, y un segundo polipéptido que comprende una segunda región Fc que comprende una segunda cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que comprende una segunda región CH3, en donde dicha primera cadena pesada se une a un primer epítomo y dicha segunda cadena pesada se une a un segundo epítomo, en donde dichos epítomos primero y segundo son diferentes, y en donde las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda son diferentes y son de manera que la interacción heterodimérica entre dichas regiones CH3 primera y segunda es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3 primera y segunda, y

- a) en donde dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central, y

- b) en donde dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409 de acuerdo con la numeración EU y una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra central.

25. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 23 o la reivindicación 24, en donde la primera región Fc es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y en donde la segunda región Fc es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.

26. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde tanto dicha primera como dicha segunda región Fc son del isotipo IgG1.

27. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en donde dicha primera región CH3 no tiene más de una sustitución de aminoácido y la segunda región CH3 no tiene más de una sustitución

de aminoácido con respecto a las regiones CH3 de tipo silvestre.

28. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en donde dichas regiones CH3 primera y segunda, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

29. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en donde dichas cadenas pesadas de longitud completa primera y segunda, excepto por cualquier mutación especificada, son de un anticuerpo humano o humanizado.

30. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, que comprende además dos cadenas ligeras de longitud completa.

31. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, en donde dicho primer y/o segundo polipéptido comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación ligada a Asn.

32. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 31, en donde dicho primer y/o segundo polipéptido se conjuga con un fármaco, un profármaco o una toxina o contiene un grupo aceptor para el mismo.

33. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, en donde dicho primer y/o segundo epítipo se ubica en una célula tumoral; en donde dicho primer o dicho segundo epítipo se ubica en una célula tumoral y el otro epítipo se ubica en una célula efectora; en donde dicho primer o segundo epítipo se ubica en un linfocito T, tal como en CD3 expresado en un linfocito T; en donde la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se unen a diferentes epítopos en la misma célula tumoral; o en donde la primera cadena pesada se une a un epítipo en una célula tumoral, y la otra cadena pesada es de un anticuerpo irrelevante o inactivo sin ninguna actividad de unión *in vivo* relevante para la aplicación prevista.

34. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 33, en donde dichos epítopos primero y segundo se ubican en una célula tumoral y en donde el anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una diana seleccionada del grupo que consiste en: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de la envoltura de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM y MRP3.

35. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 33, en donde dichos epítopos primero y segundo se ubican en una célula tumoral y en donde dicho anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una combinación diana seleccionada del grupo que consiste en: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

36. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 33, en donde dicho primer o segundo epítipo se ubica en una célula tumoral y el otro epítipo se ubica en una célula efectora, en donde el anticuerpo biespecífico tiene especificidad de unión para una diana seleccionada del grupo que consiste en: FcγRI (CD64), FcγRIII (CD16), CD3, CD89, CD32a, FcεRI.

37. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 33, que tiene especificidad de unión para una combinación de dianas seleccionada de: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA de clase II, CD38 + CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + brazo no de unión y combinaciones de receptores acoplados a proteína G.

38. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 37 para su uso como medicamento.

39. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 37 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

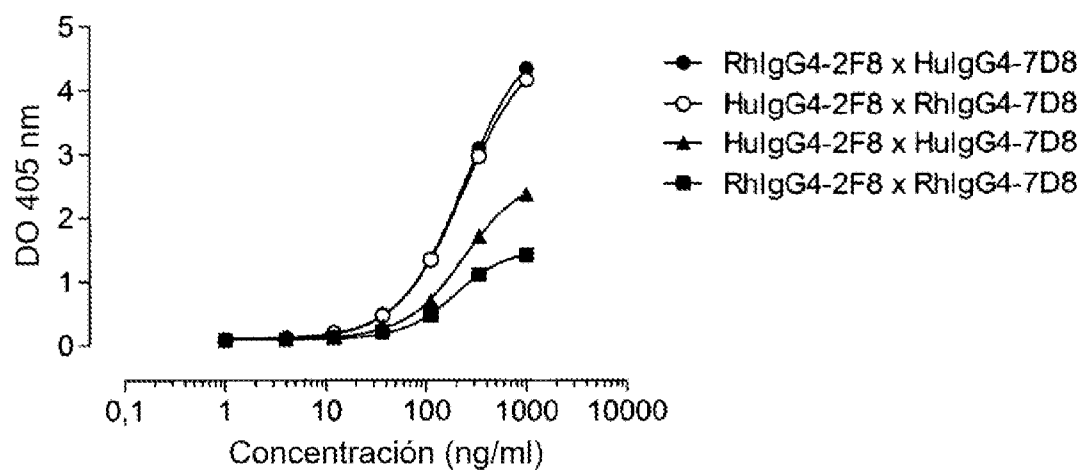
Figura 1

Figura 2

Especie (nombre común)	Isotipo	Posición de aminoácido*																		
		Núcleo-bisagra					Interfaz CH3-CH3													
		226	227	228	229	230	347	349	350	351	366	368	370	392	394	395	397	398	399	405
<i>Homo sapiens</i>	IgG1	C	P	P	C	P	Q	Y	T	L	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-
	IgG3	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	M	-	-	-
	IgG4	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Macaca mulatta</i>	IgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Macaco de la India)	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
	IgG4 (In)**	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	L	-
	IgG4 (Ch)***	-	-	A	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	L	-

*Numeración EU; **In, Indio; ***Ch, Chino

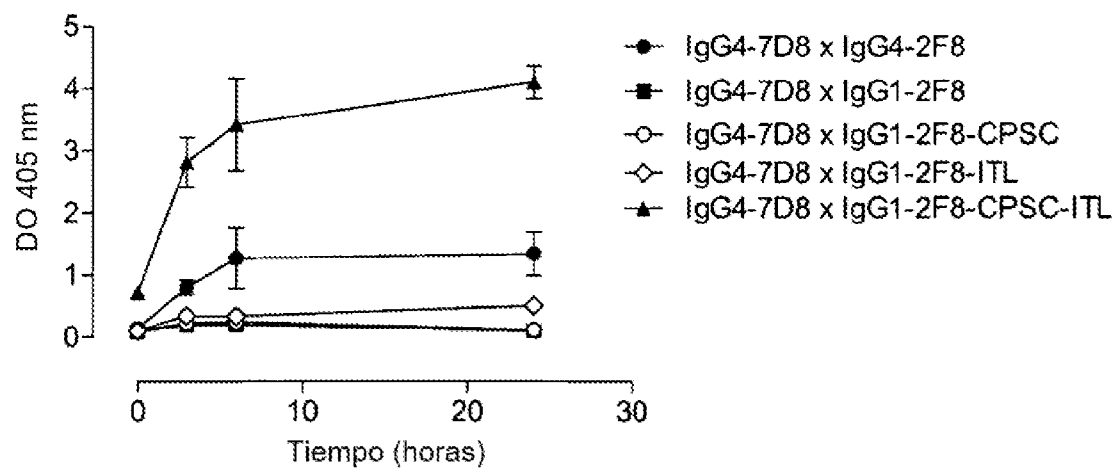
Figura 3

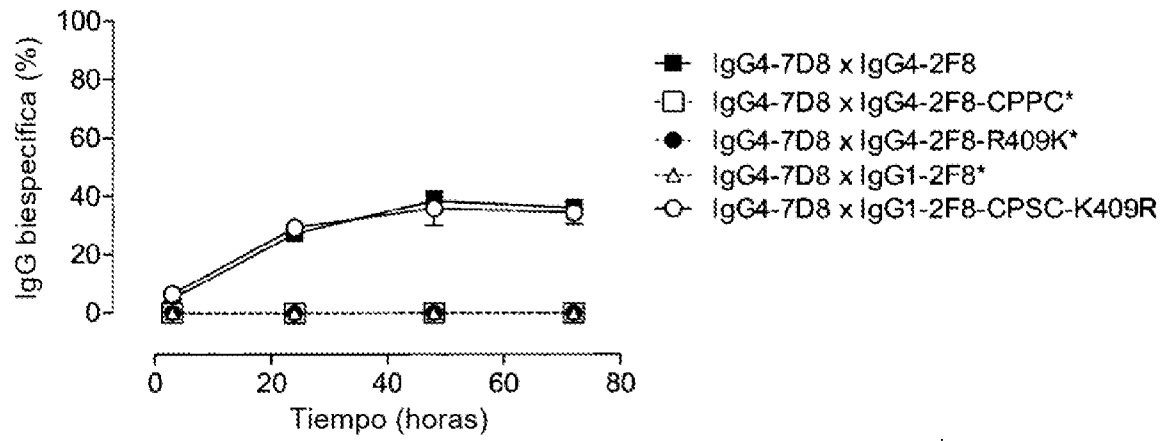
Figura 4

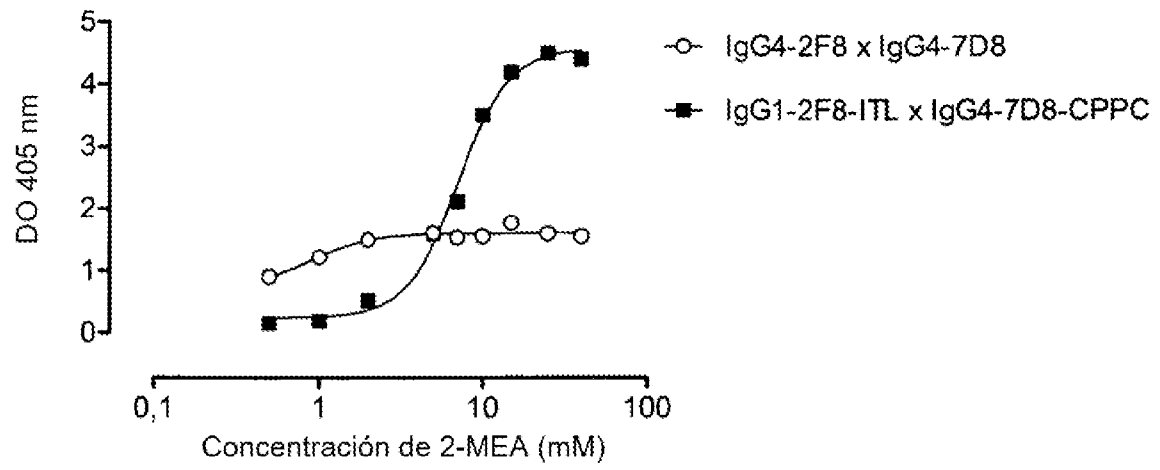
Figura 5

Figura 6

A

IgG1-2F8-ITL X IgG4-7D8-CPPC

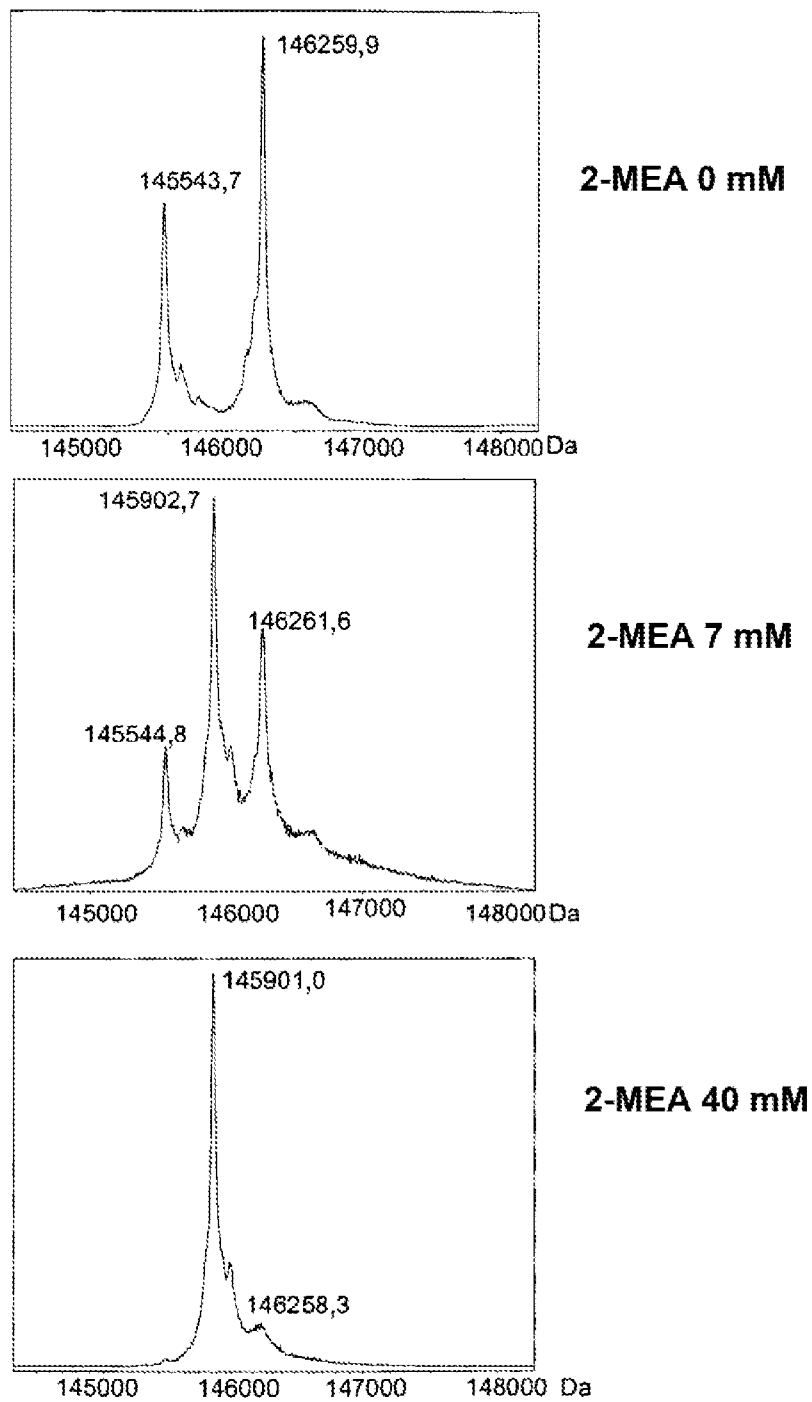


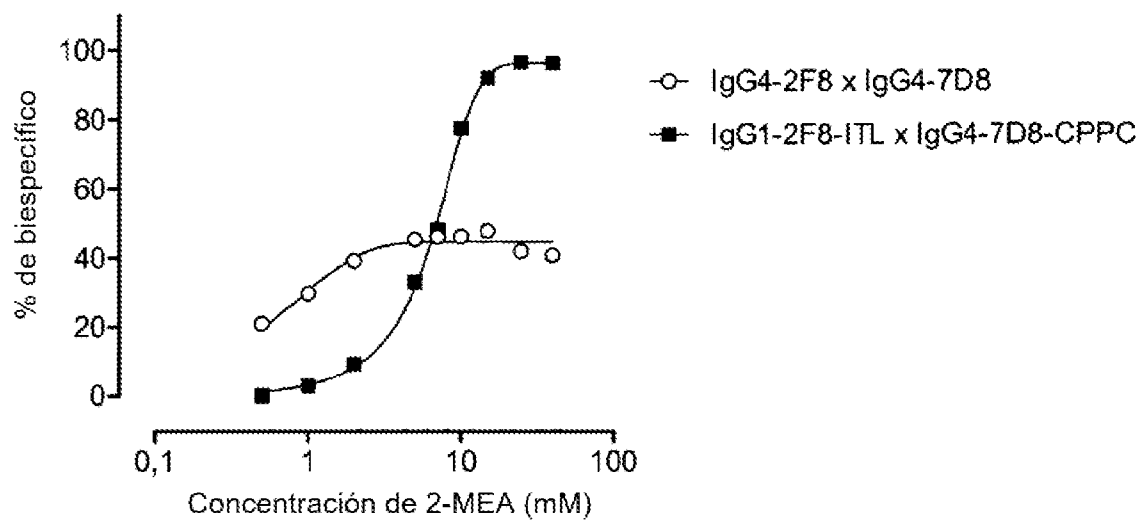
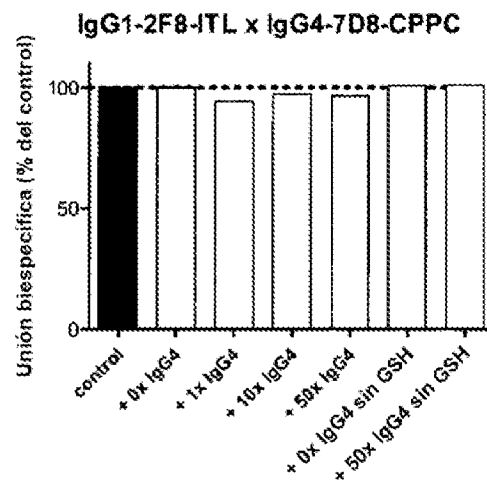
Figura 6 (continuación)**B**

Figura 7

A



B

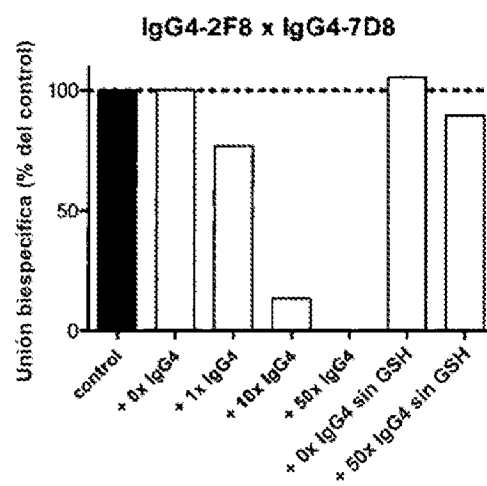


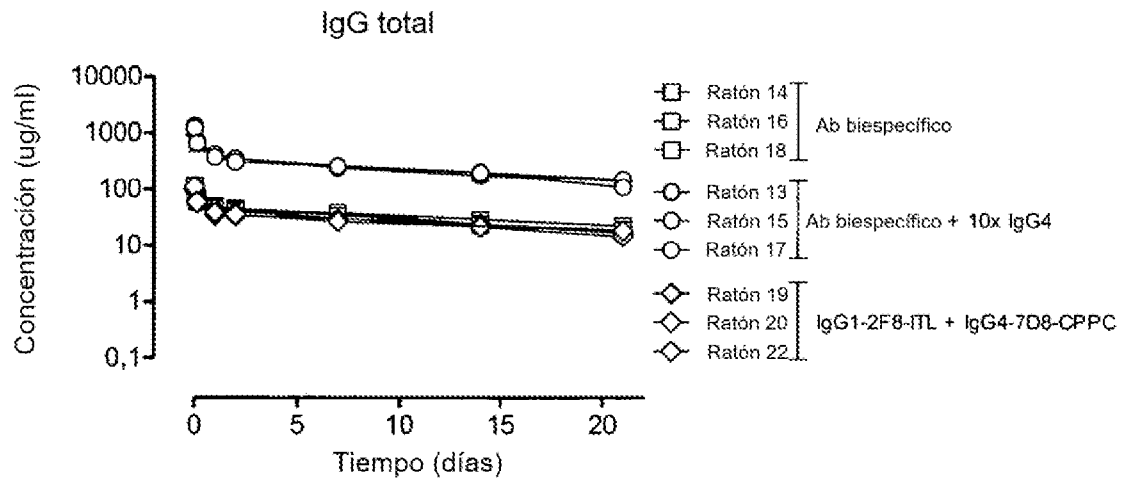
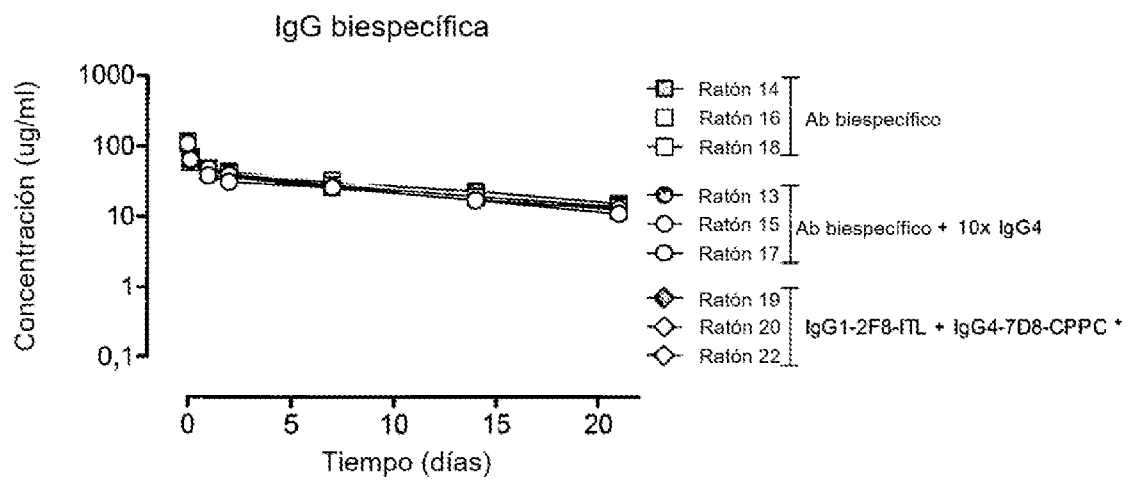
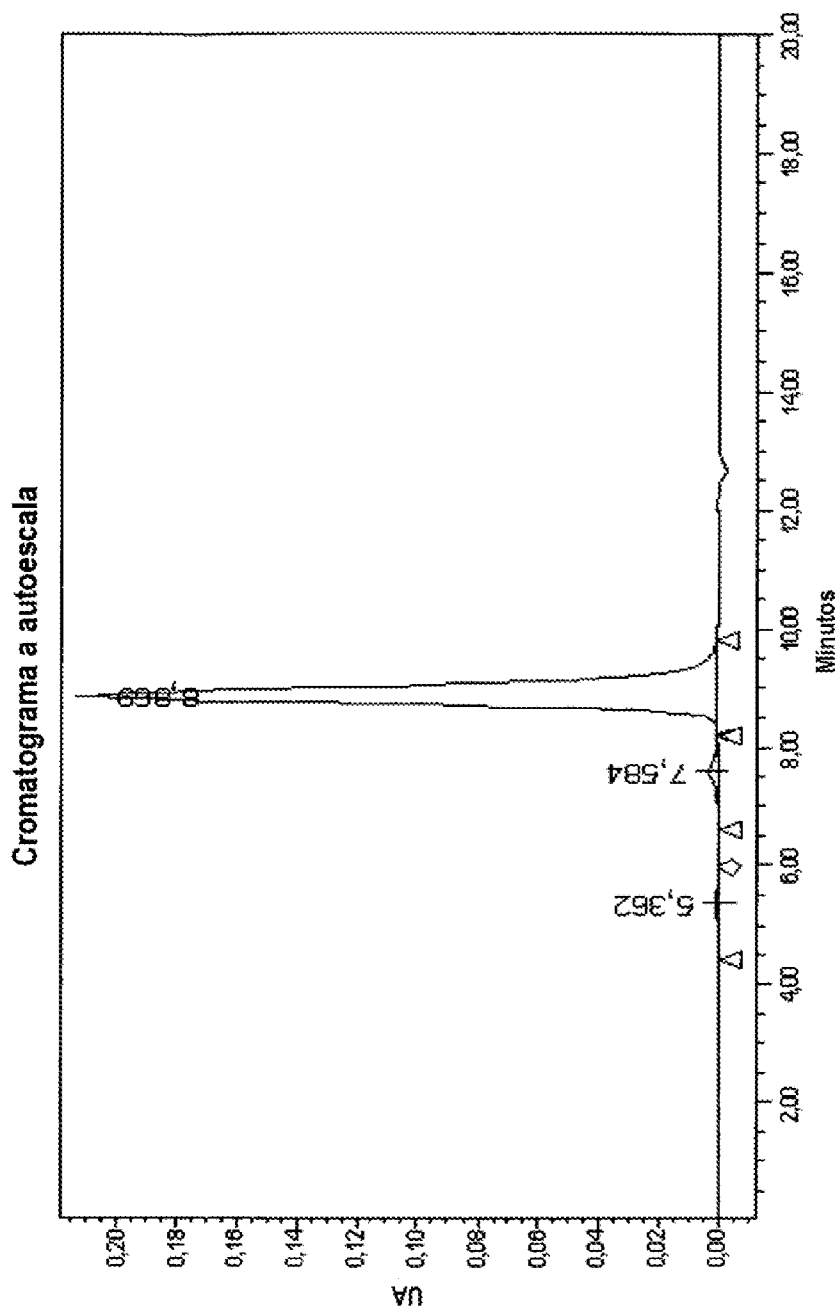
Figura 8**A****B**

Figura 9B



Resultados máximos:

	TR (min)	Área	Altura	% de la altura
1	5,362	18309	448	0,21
2	7,584	82197	2876	1,36
3	8,869	4431069	207416	98,42

Figura 9C

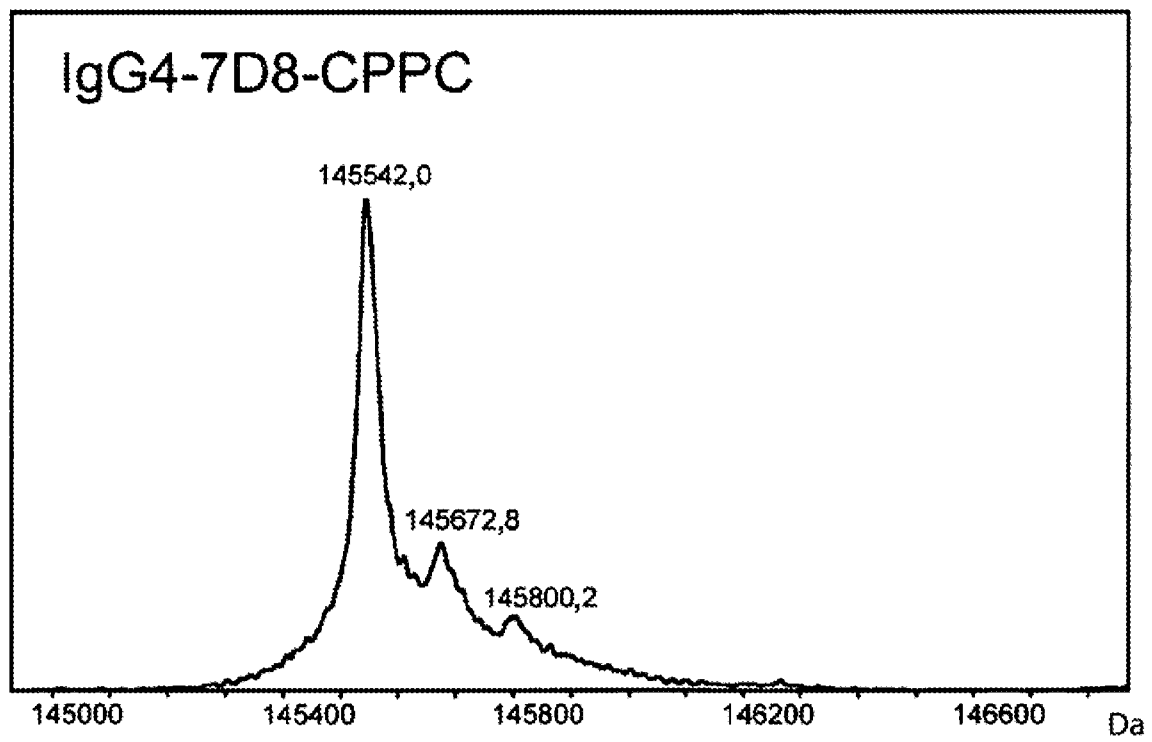
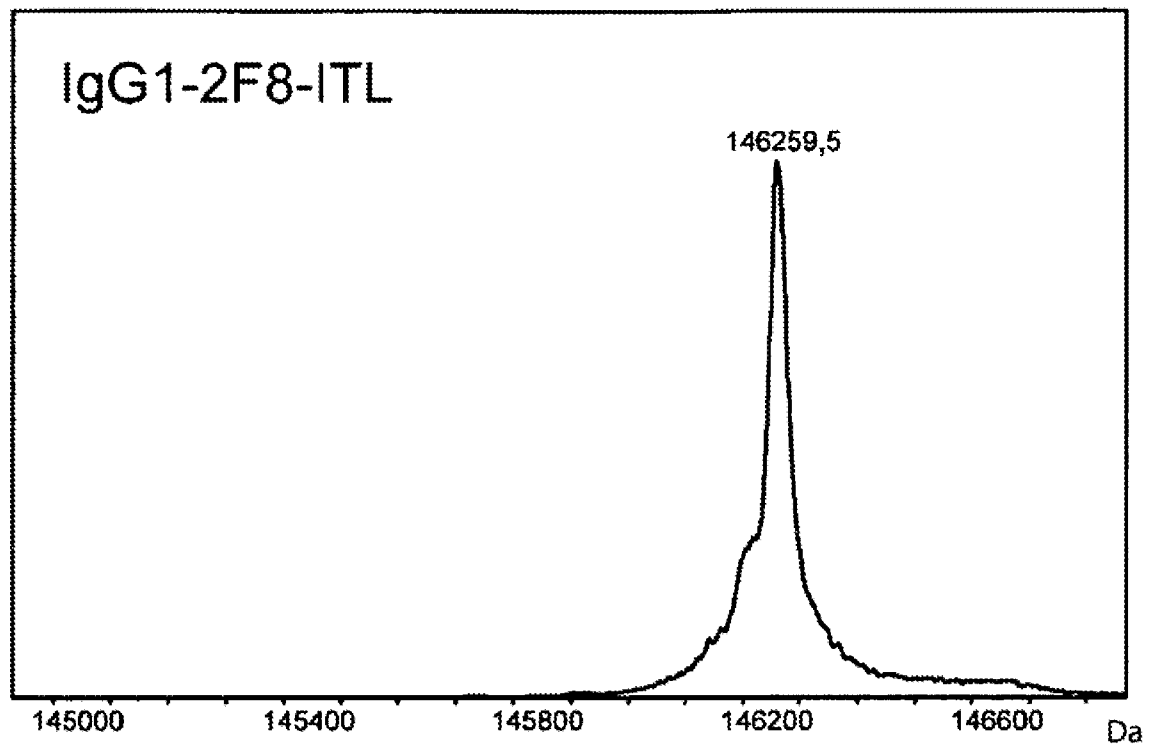
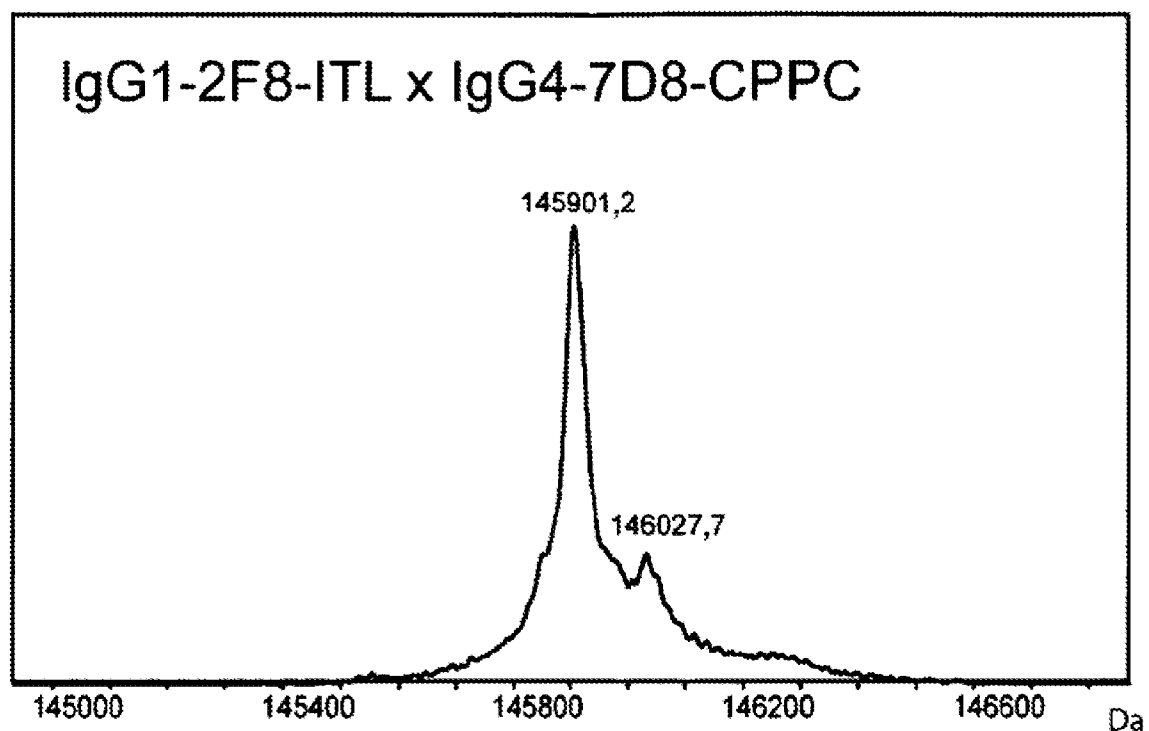


Figura 9C (continuación)



	Medido	Medido	Medido
IgG1-2F8-ITL	146259,5		
IgG4-7D8-CPPC	145542,0	145672,8	145800,2
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-	145901,2	146027,7	

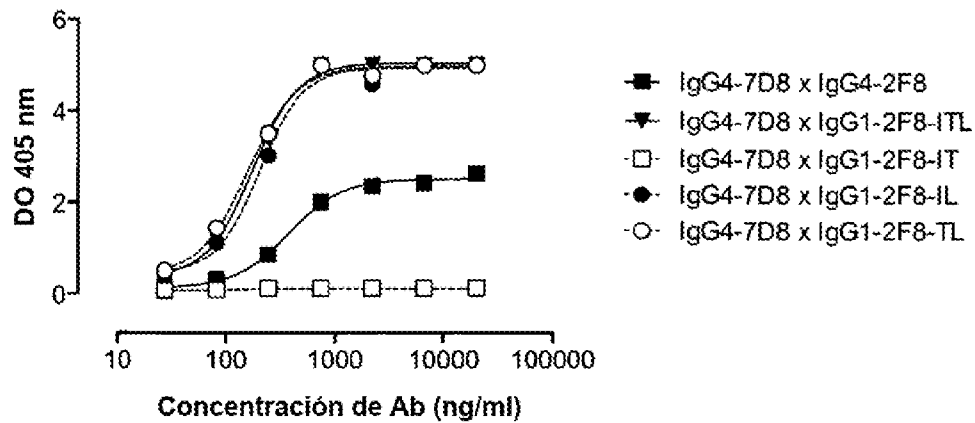
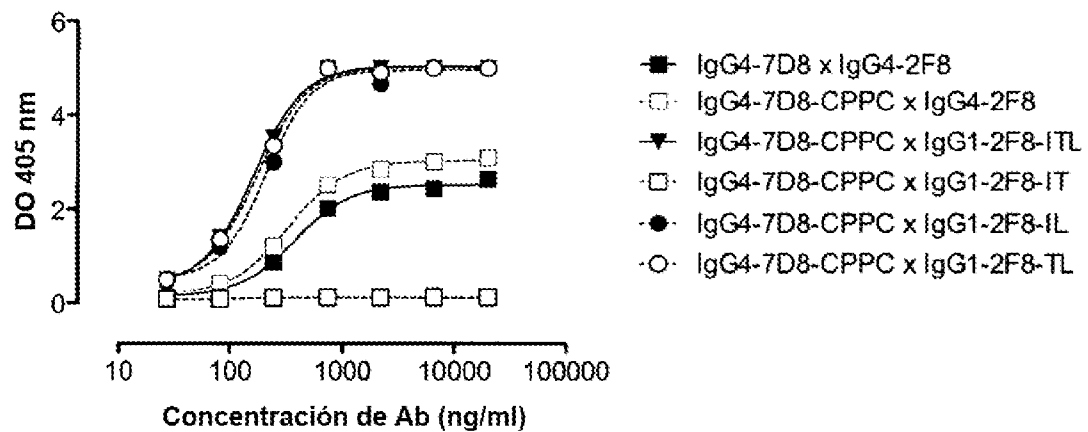
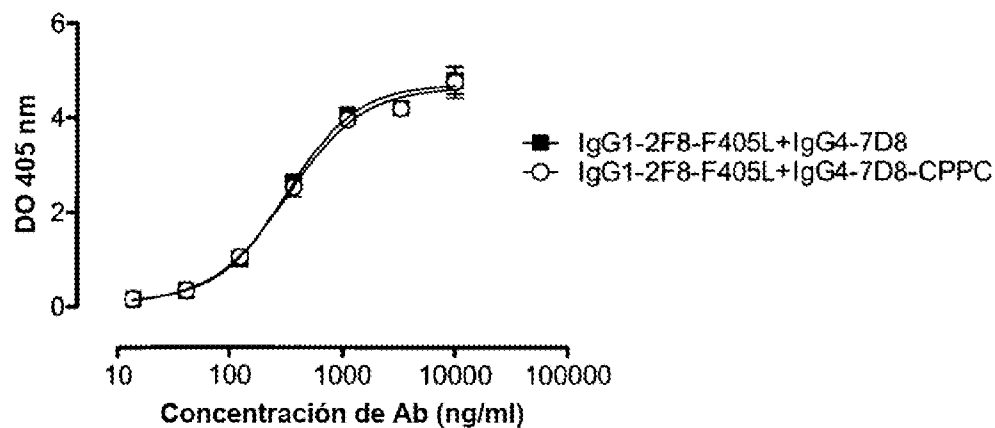
Figura 10**(A)****(B)****(C)**

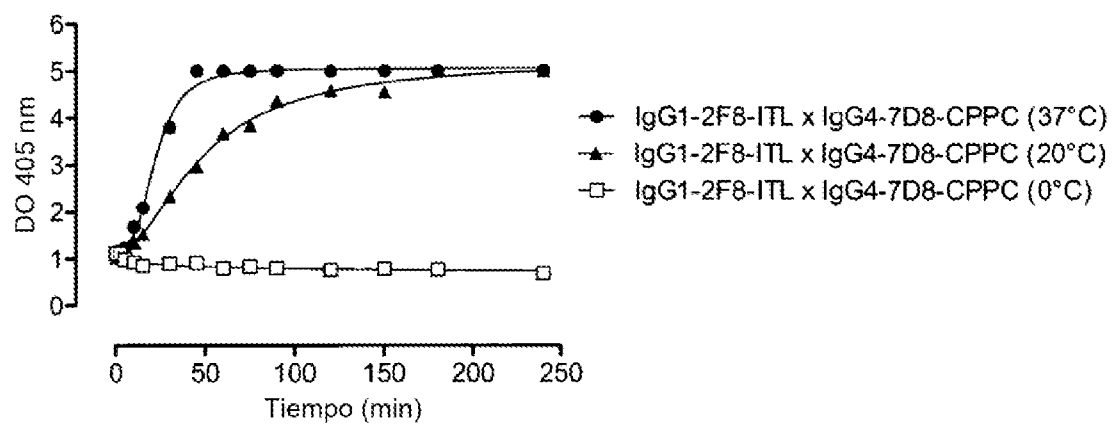
Figura 11

Figura 12

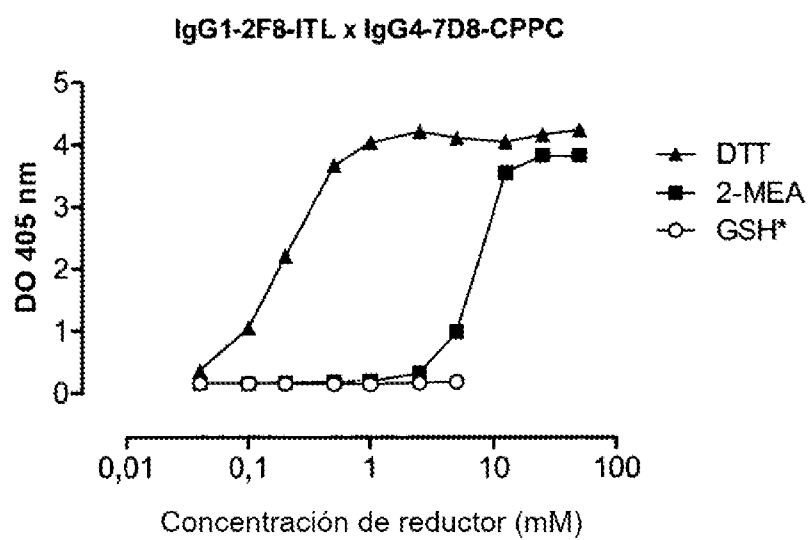
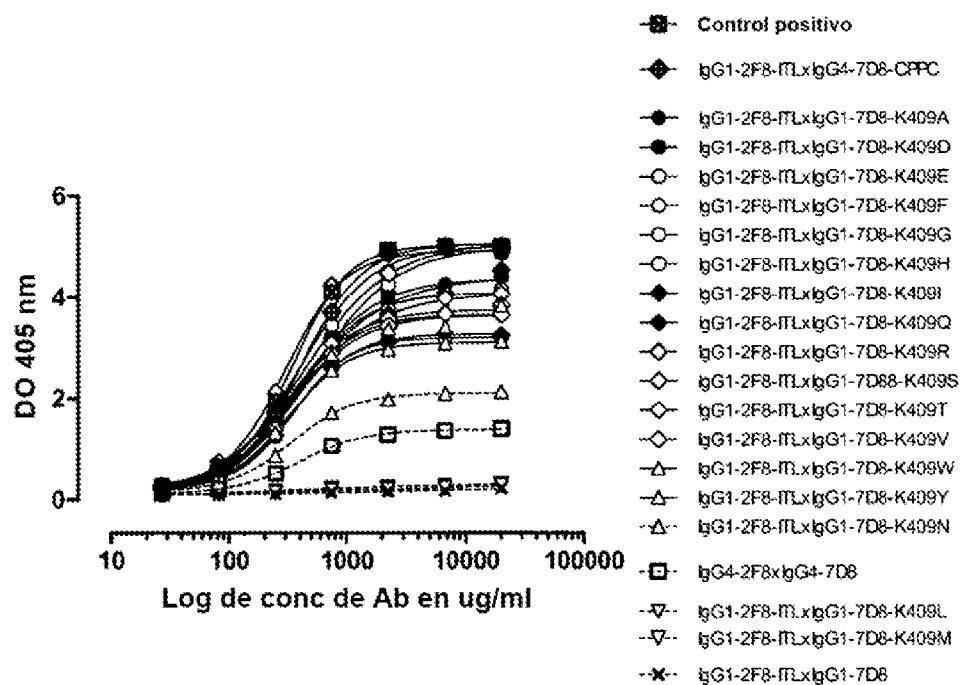


Figura 13

A



B

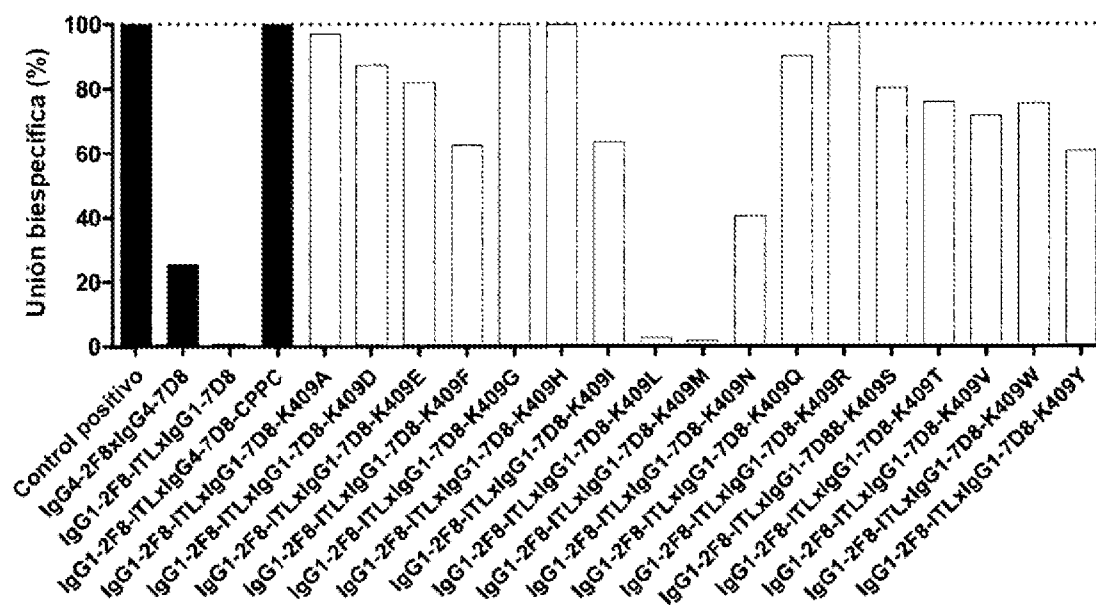


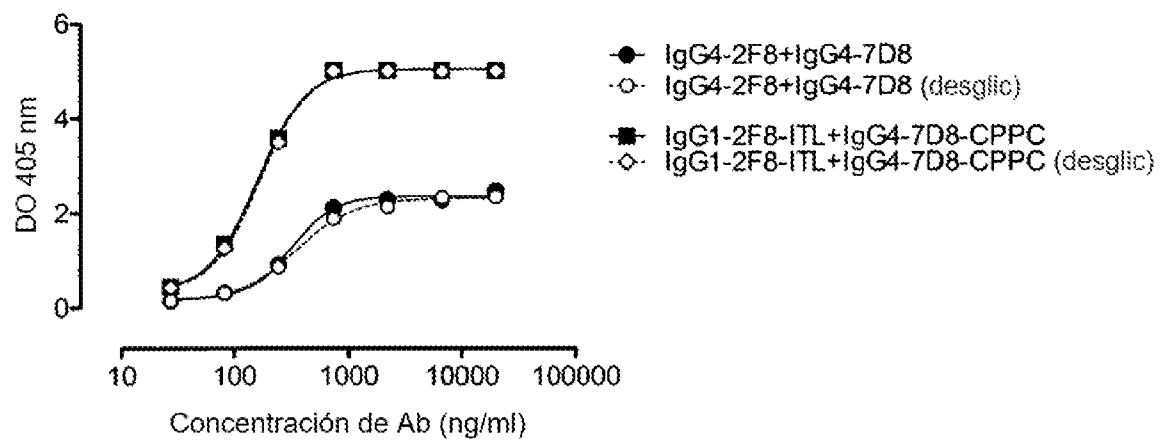
Figura 14

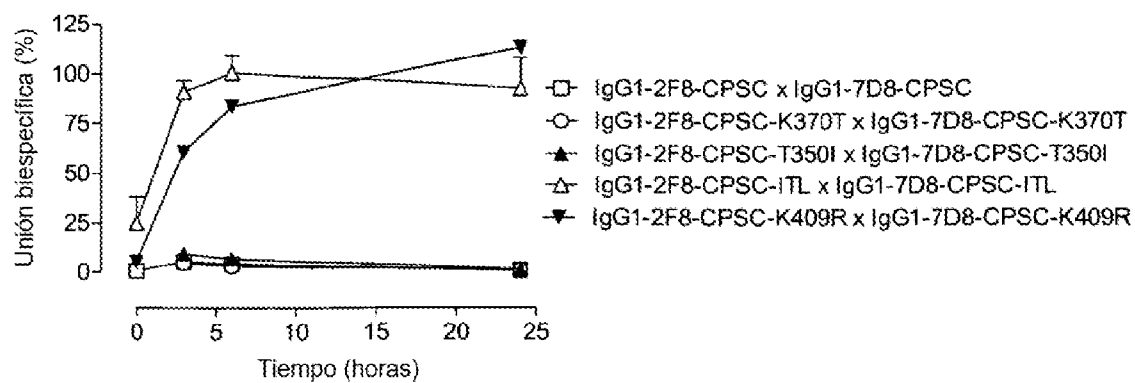
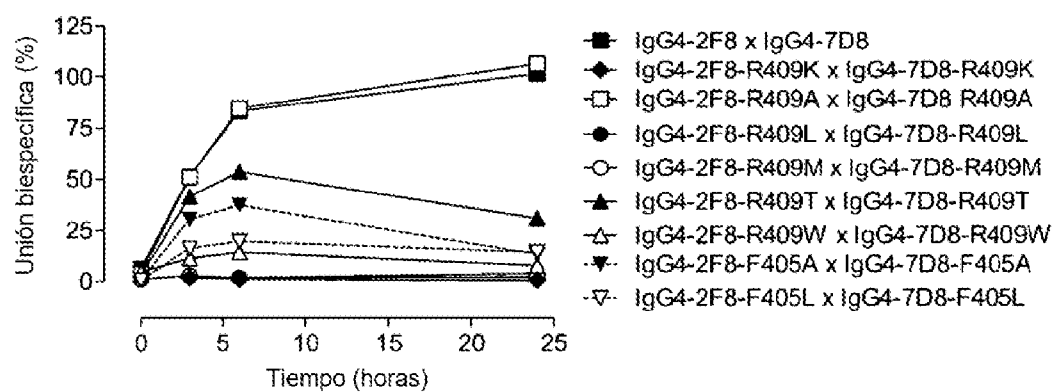
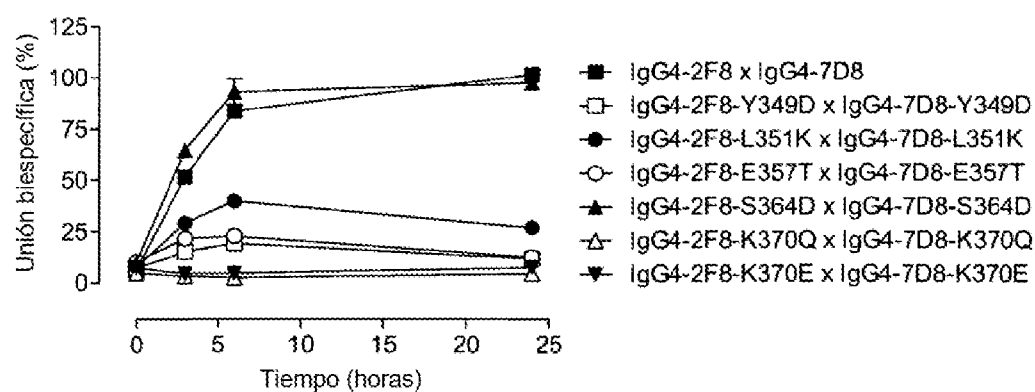
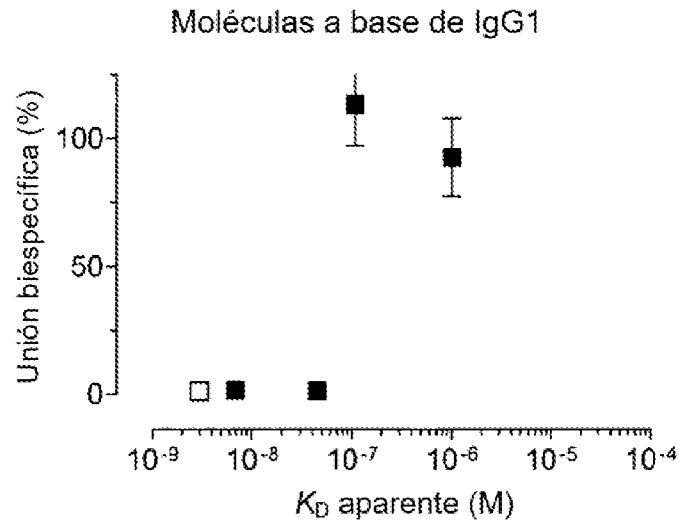
Figura 15**A****B****C**

Figura 15 (continuación)

D



E

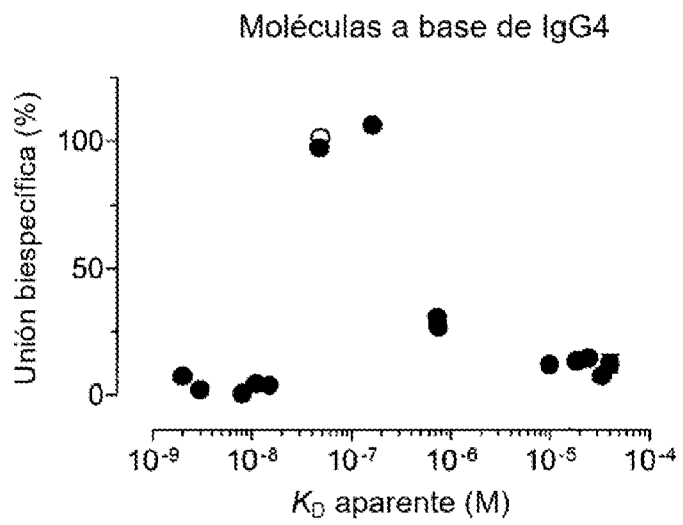


Figura 17

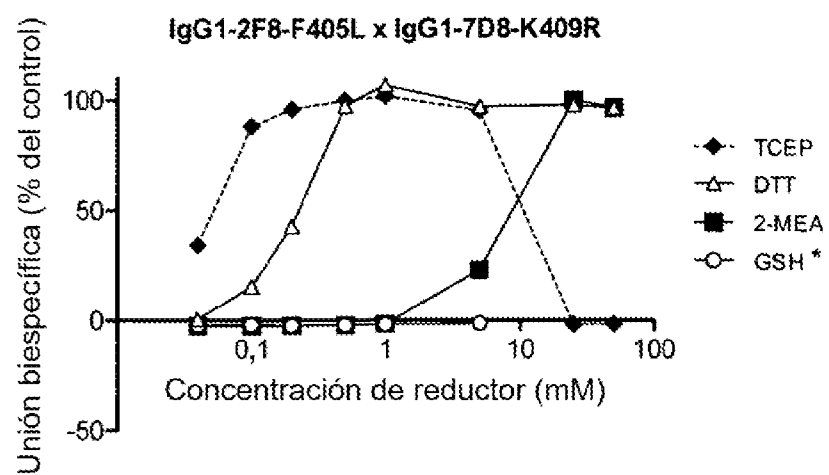
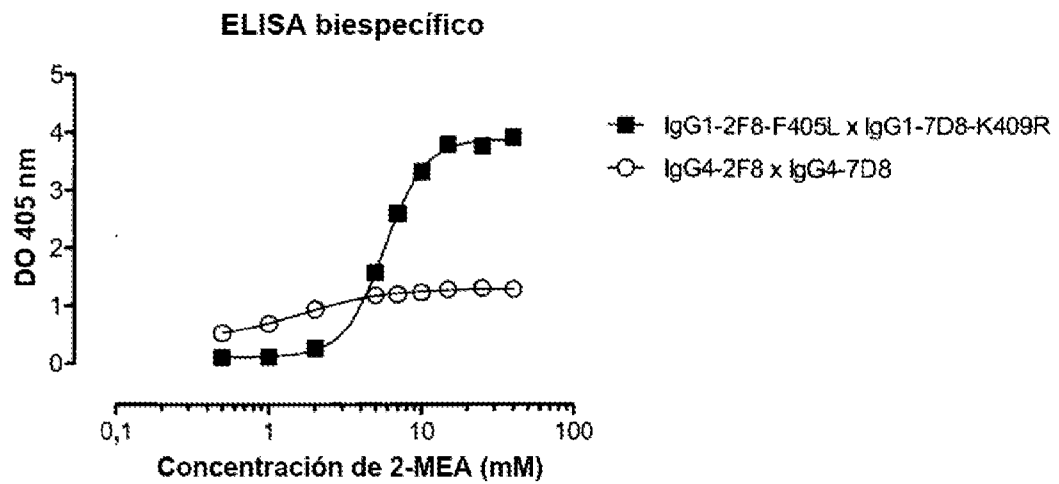


Figura 18

A



B

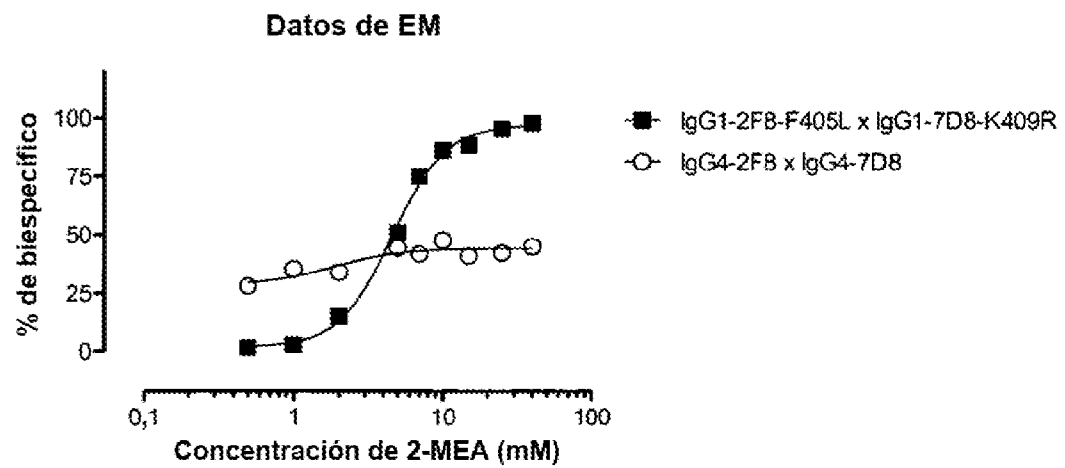


Figura 19

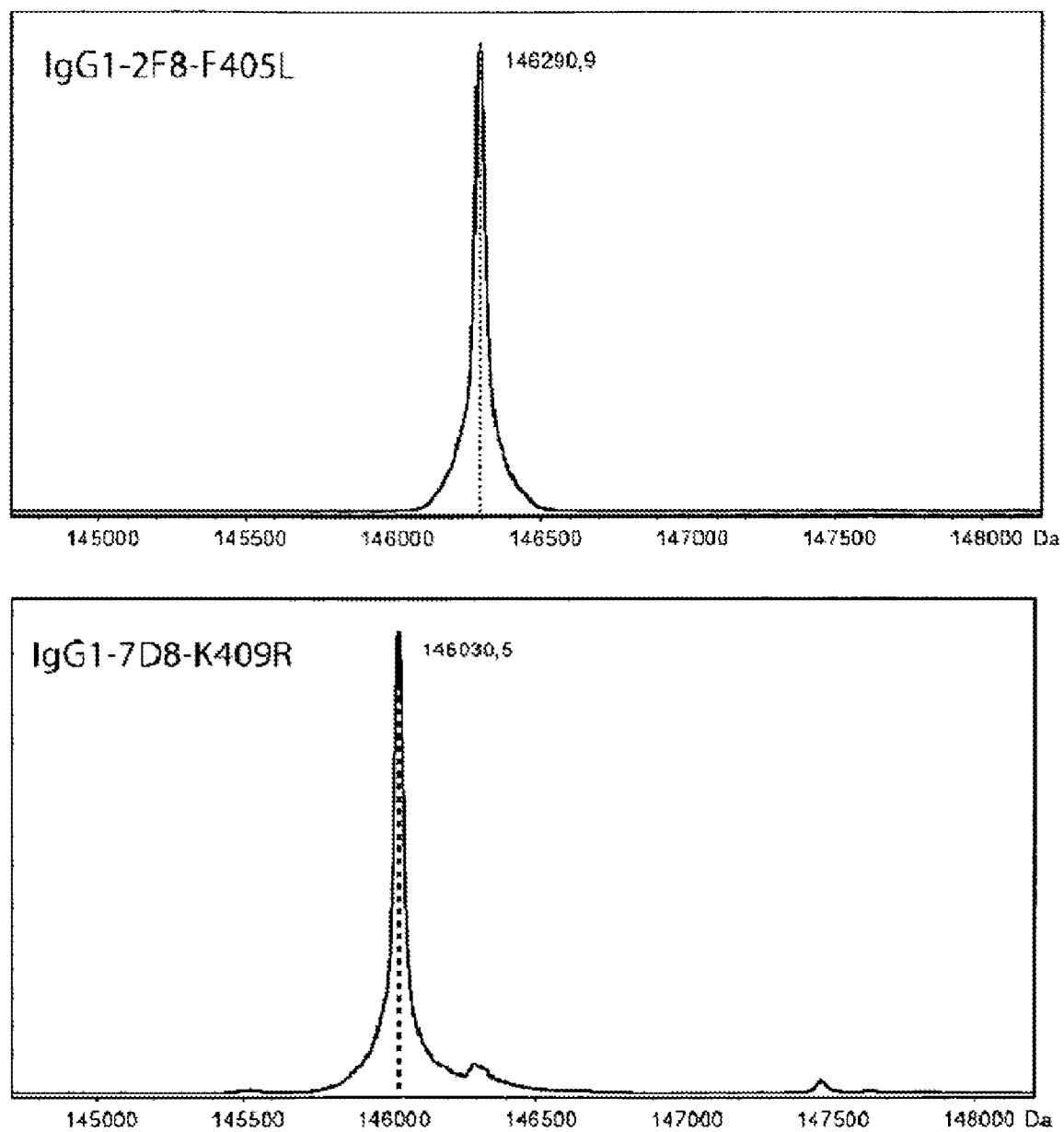
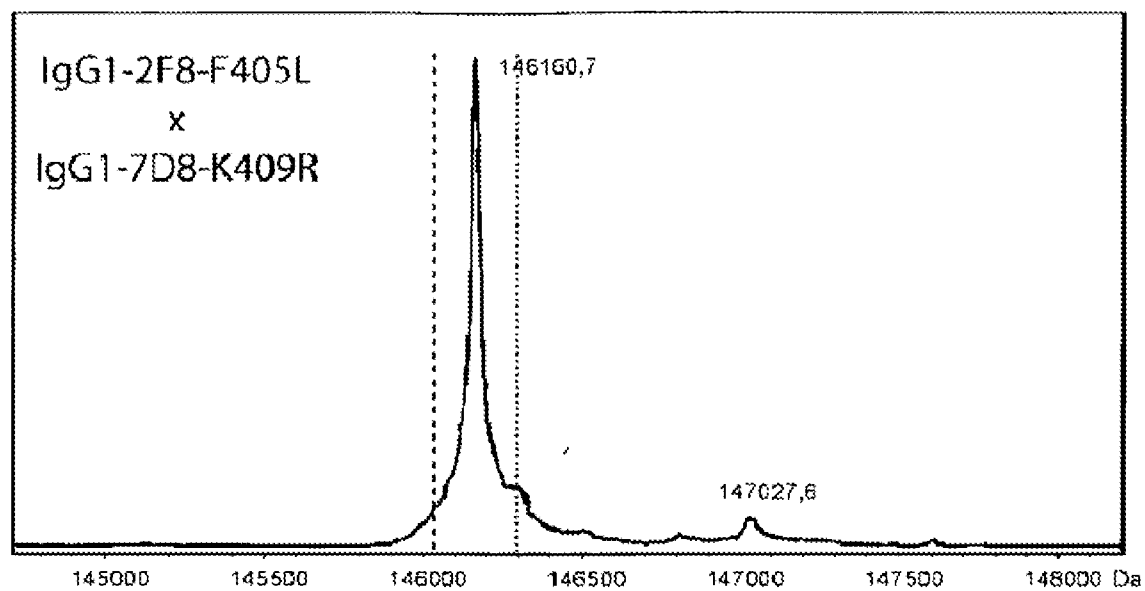
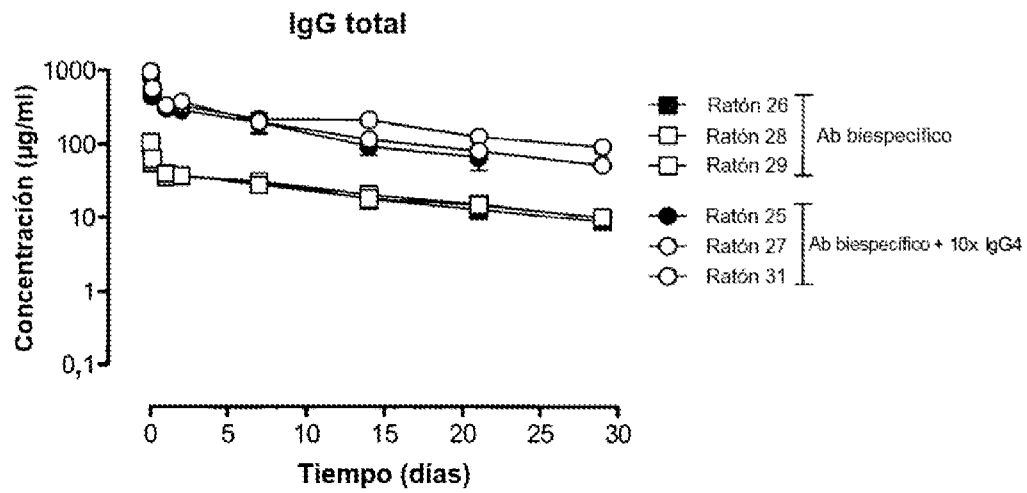


Figura 19 (continuación)

	PM medido
IgG1-2F8-F405L	146.290,9
IgG1-7D8-K409R	146.030,5
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R	146.160,7

Figura 20

A



B

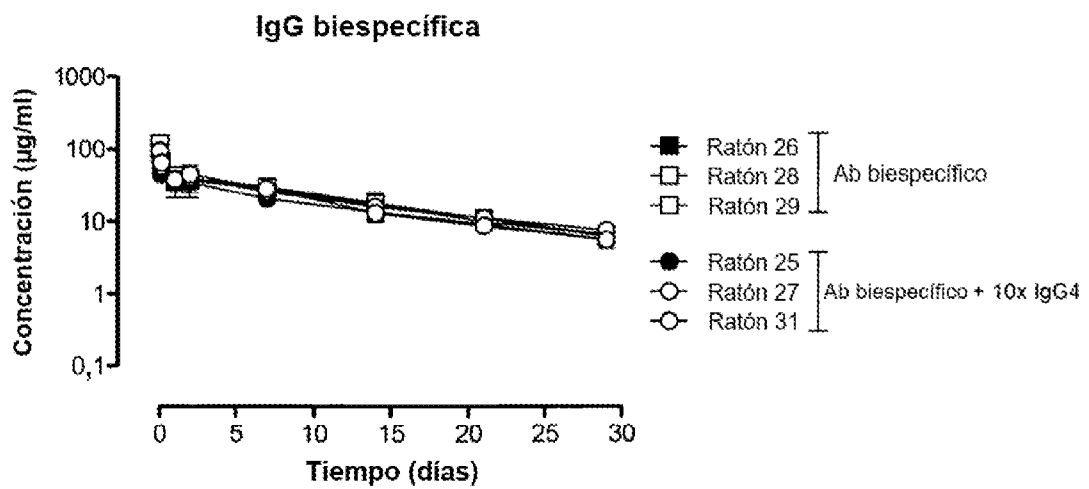


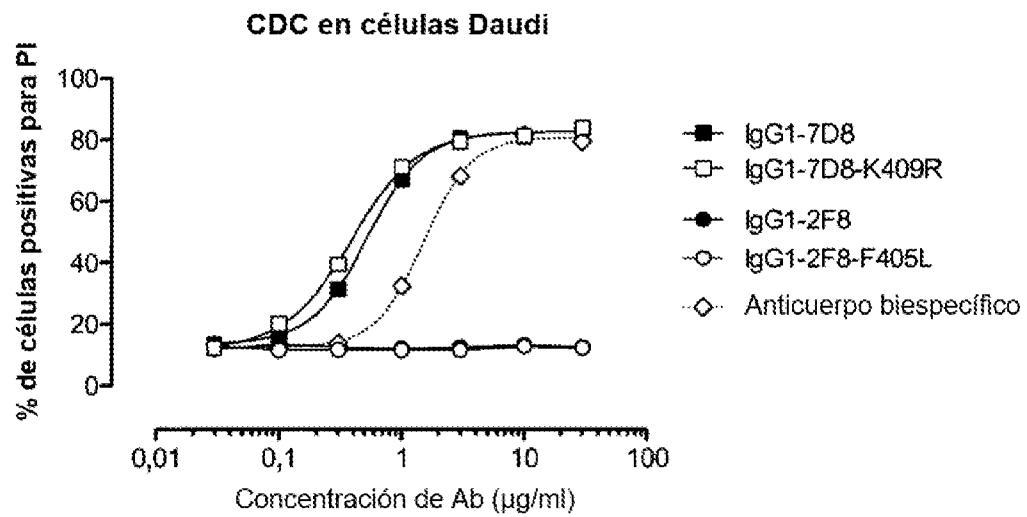
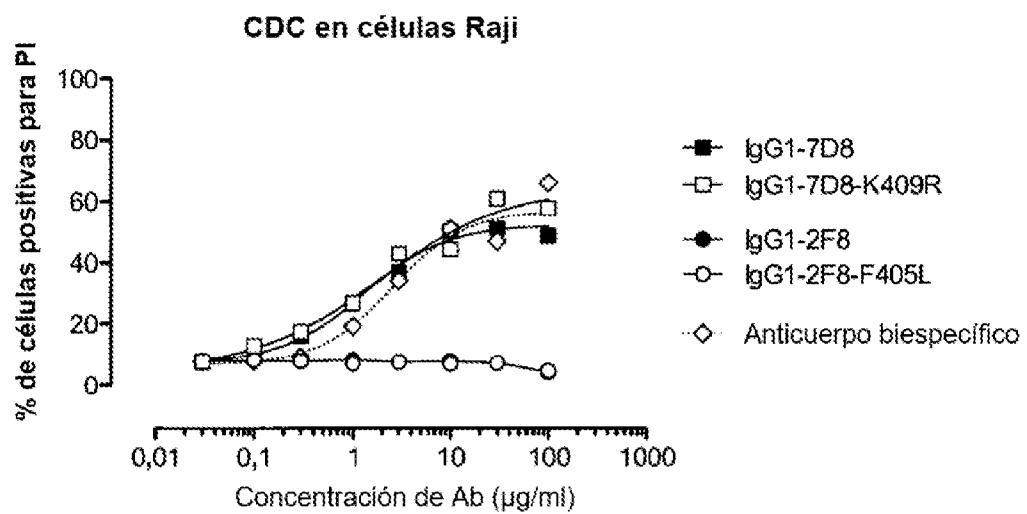
Figura 21**A****B**

Figura 22

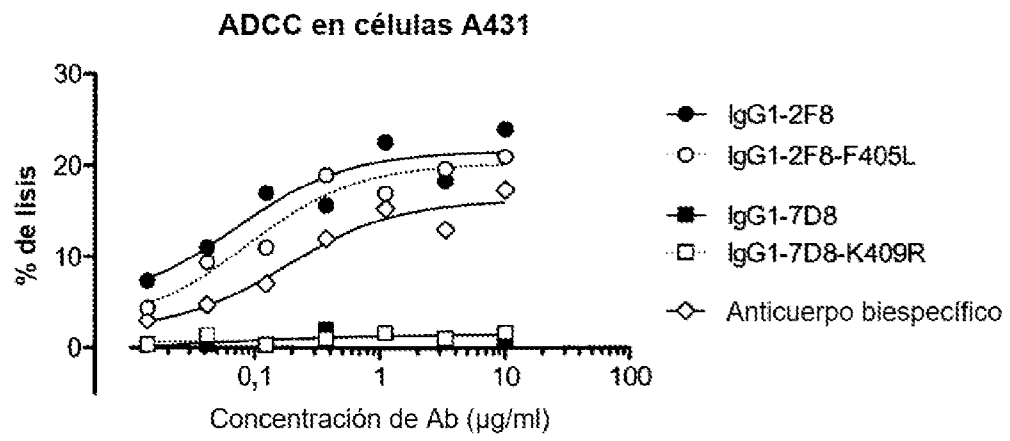
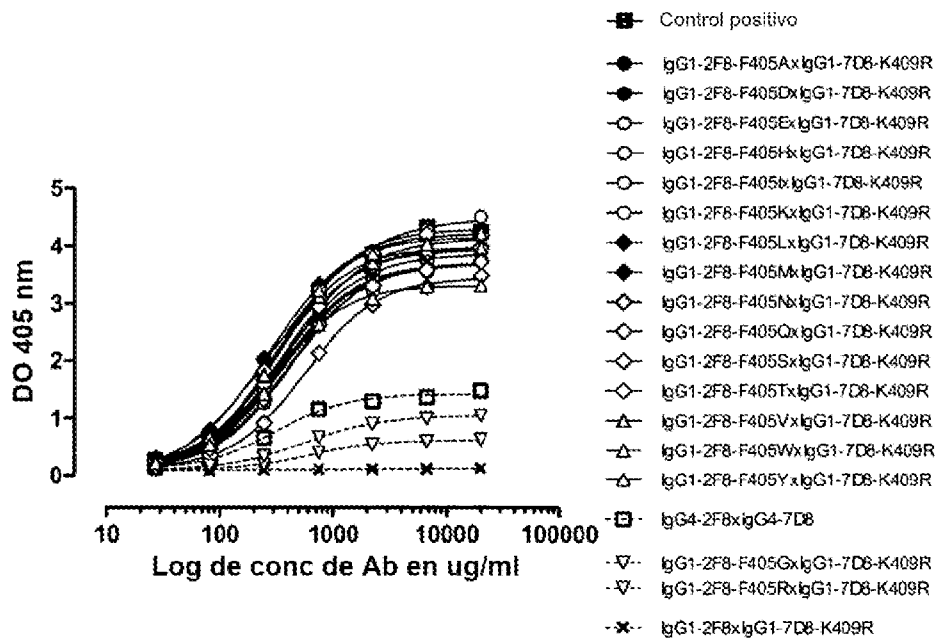


Figura 23

A



B

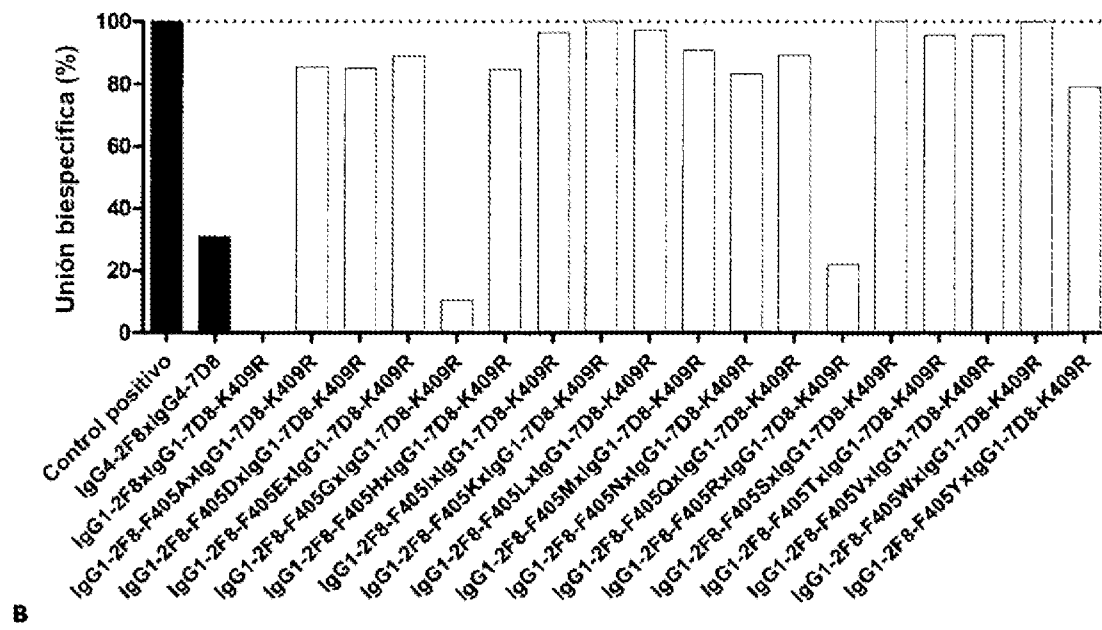
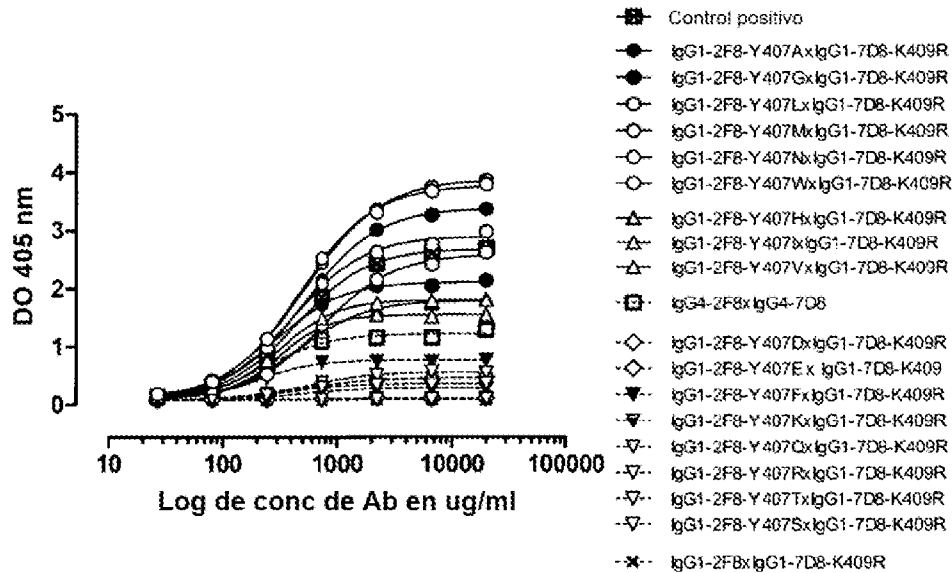


Figura 24

A



B

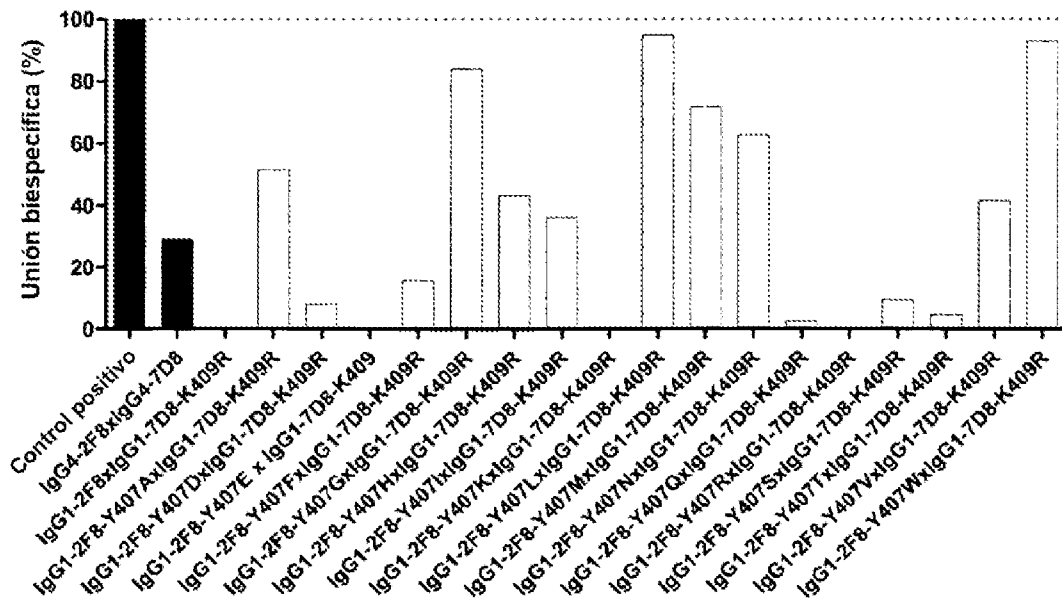


Figura 25

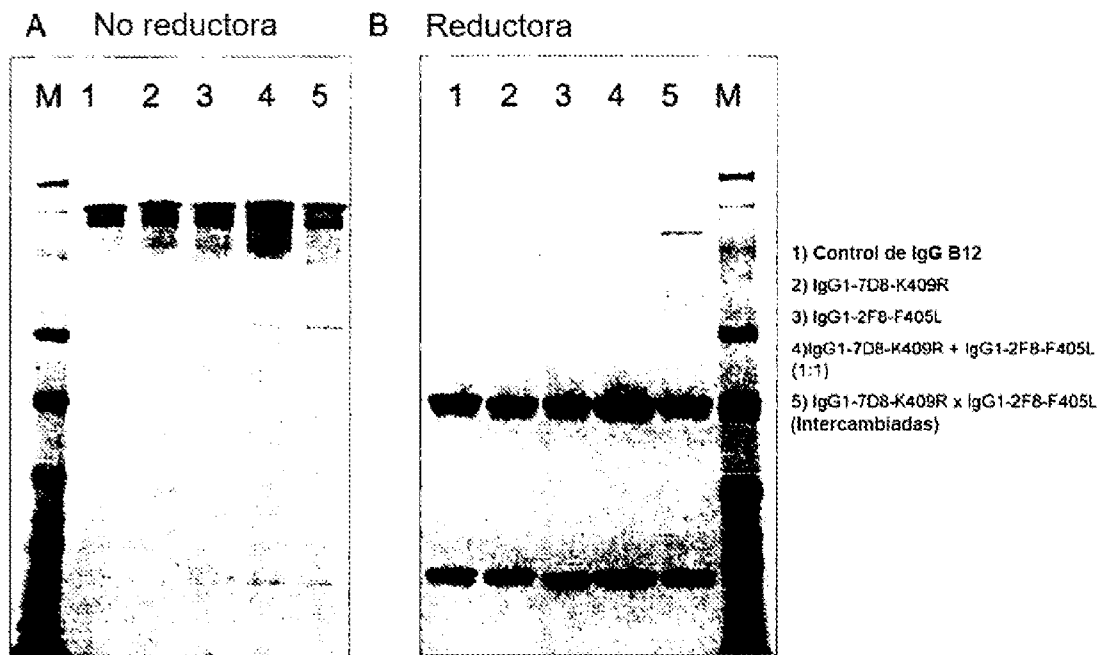


Figura 26

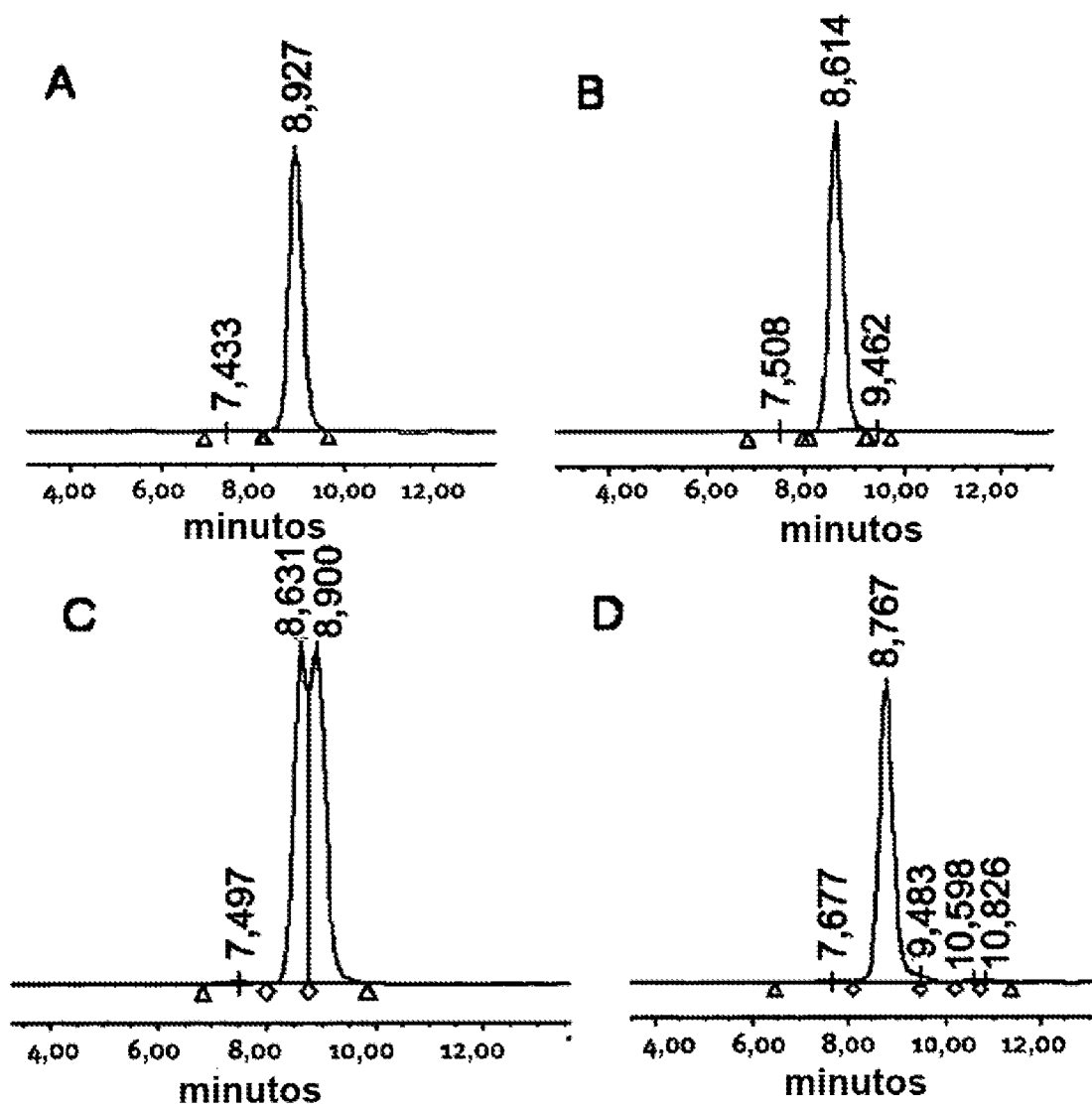


Figura 27

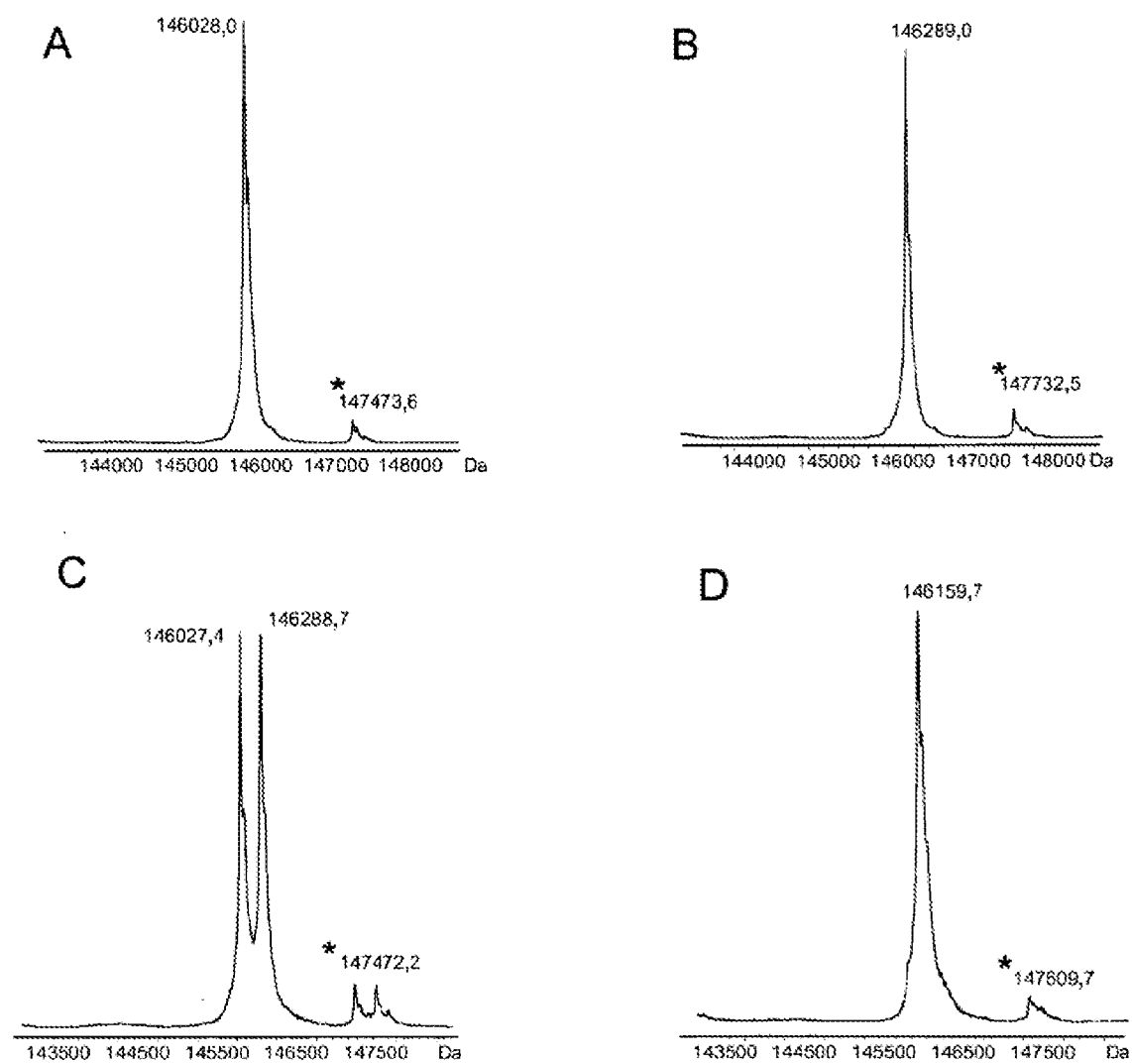
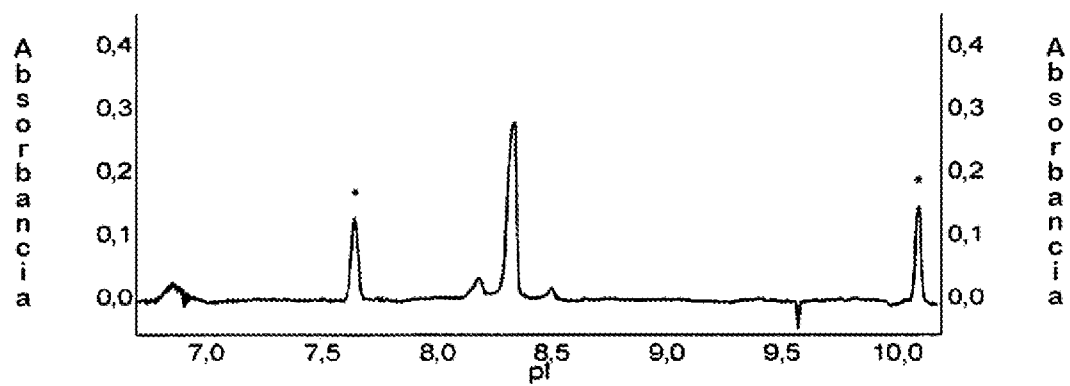
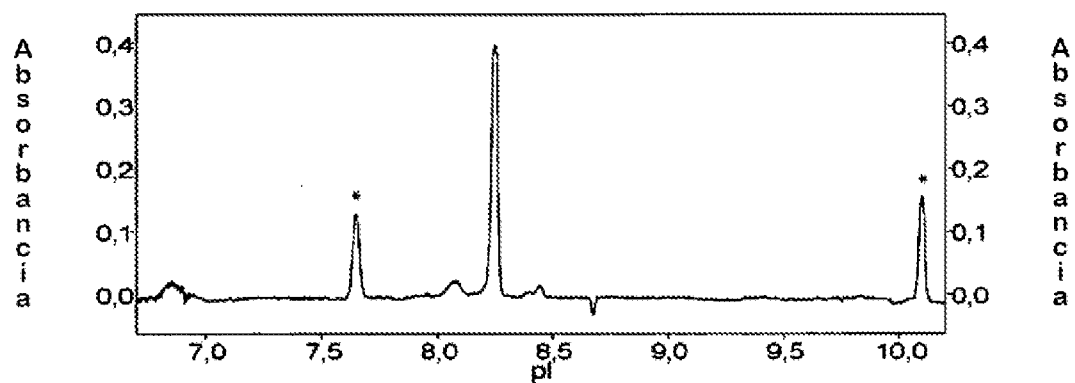


Figura 28

A



B



C

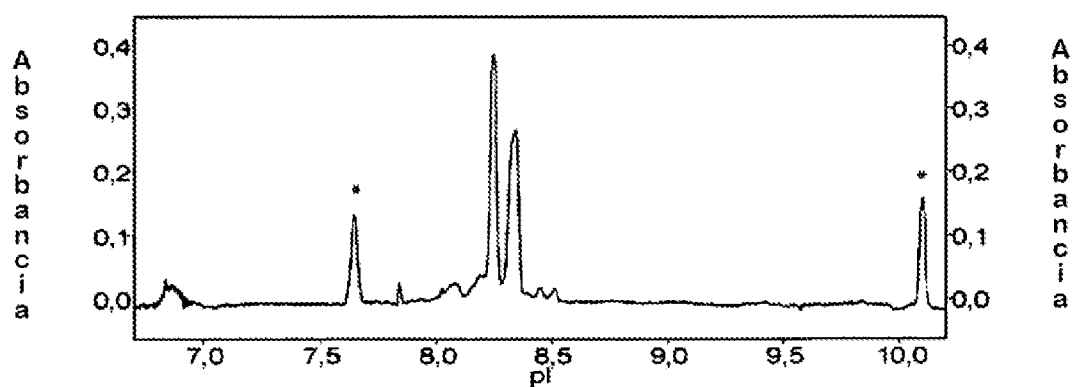


Figura 28 (continuación)

D

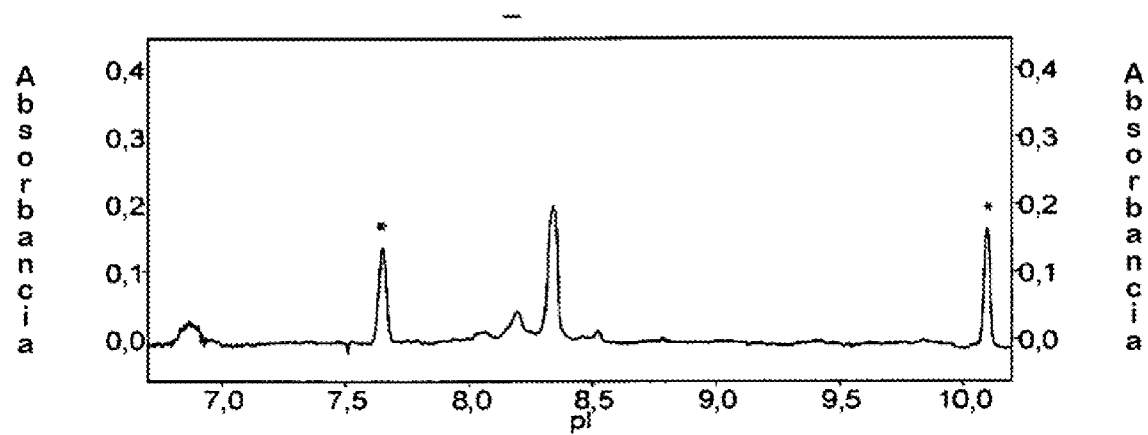


Figura 29

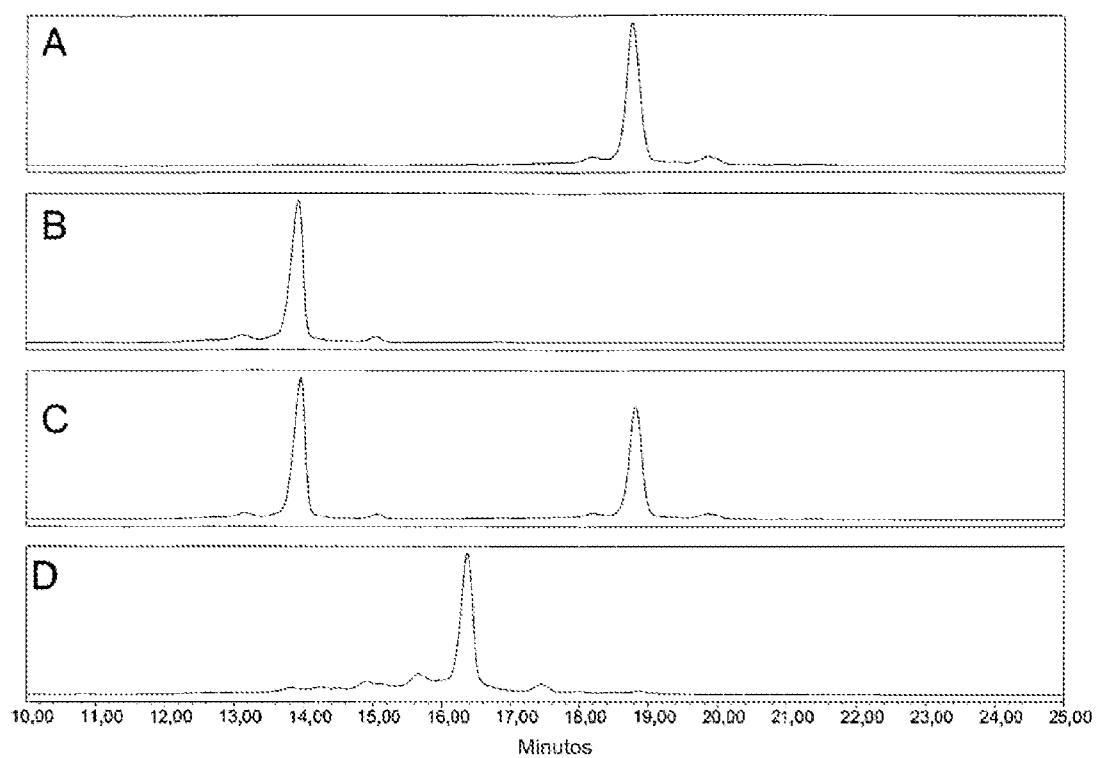


Figura 30

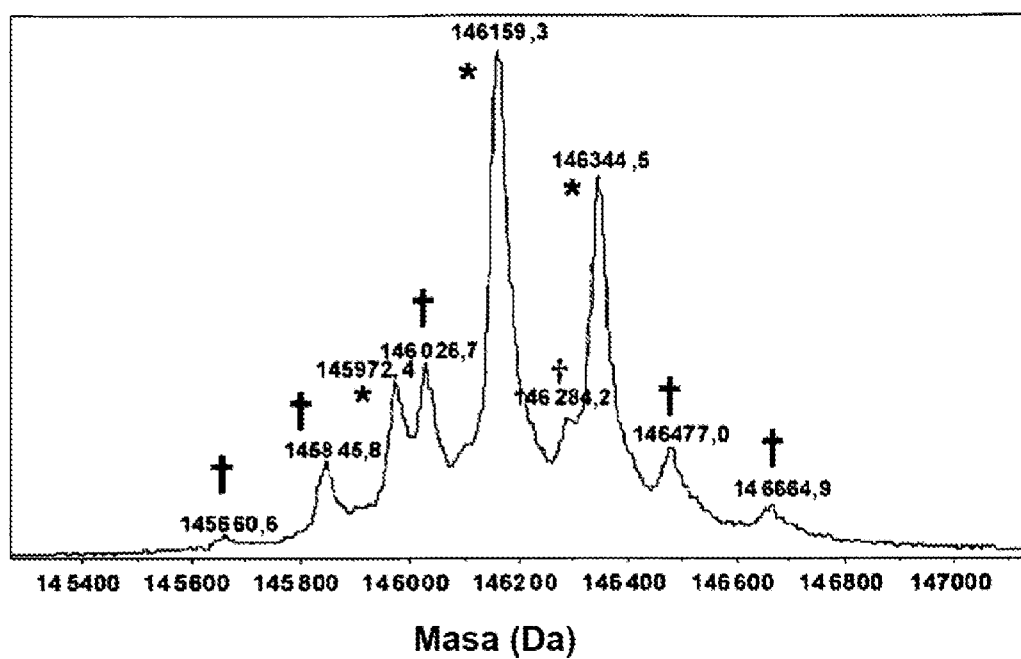


Figura 31

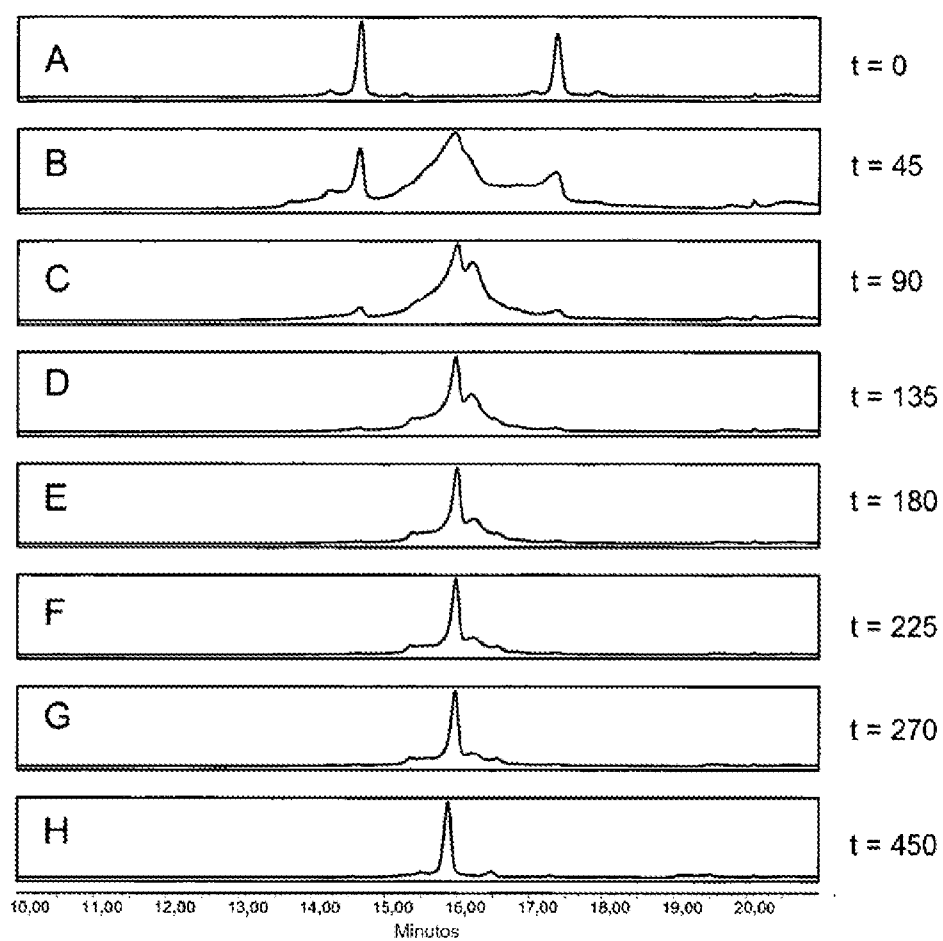


Figura 32

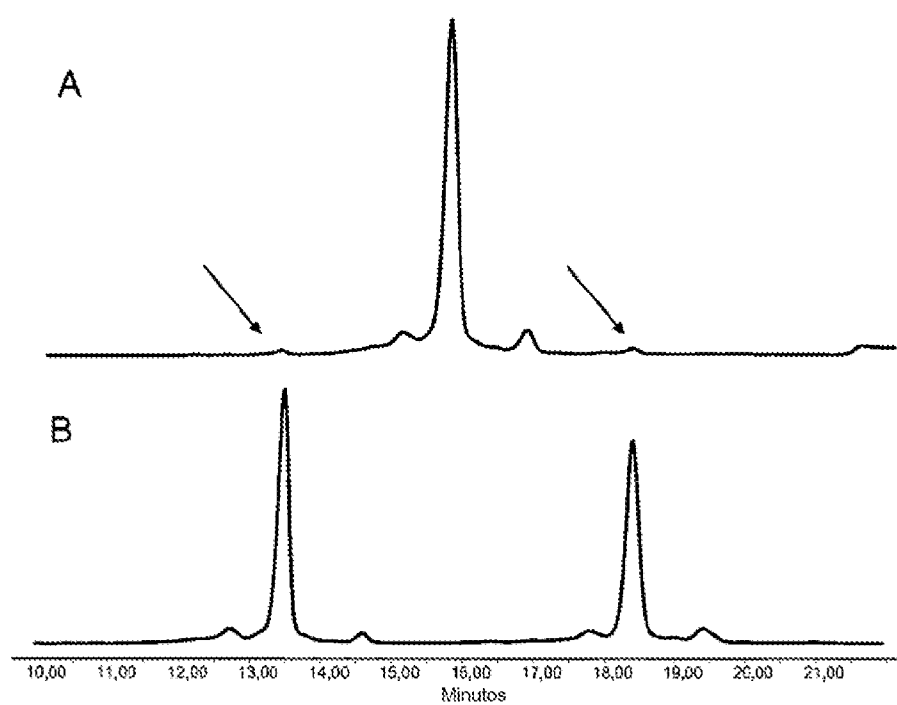
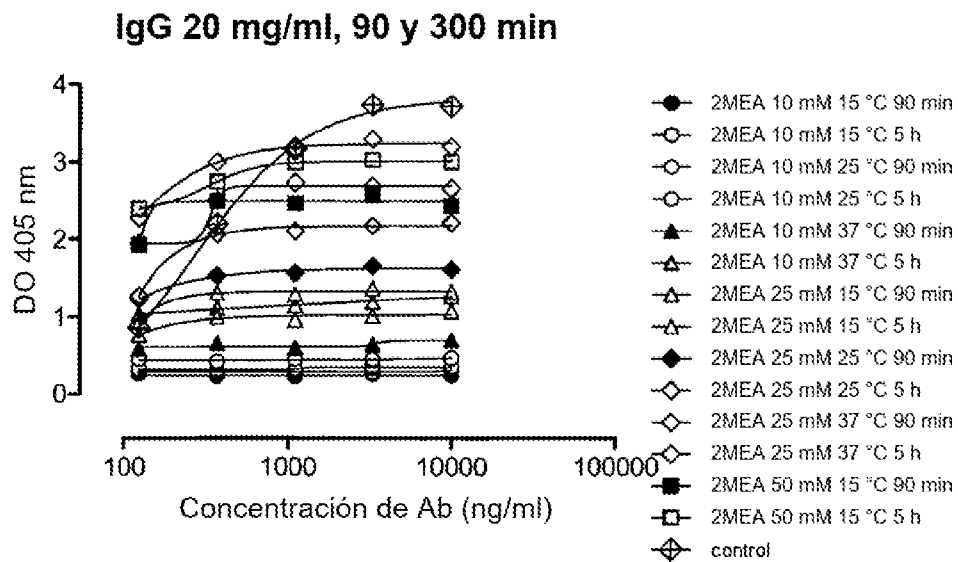


Figura 33

A



B

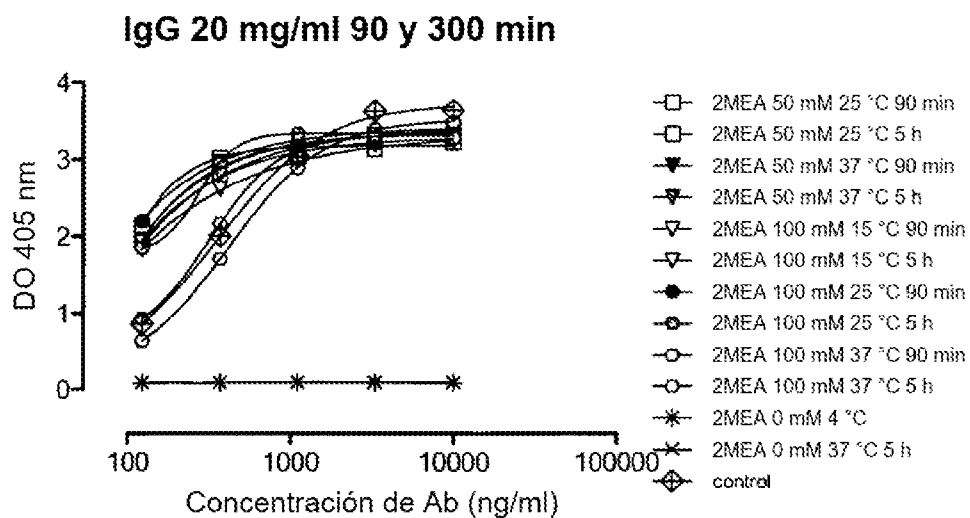
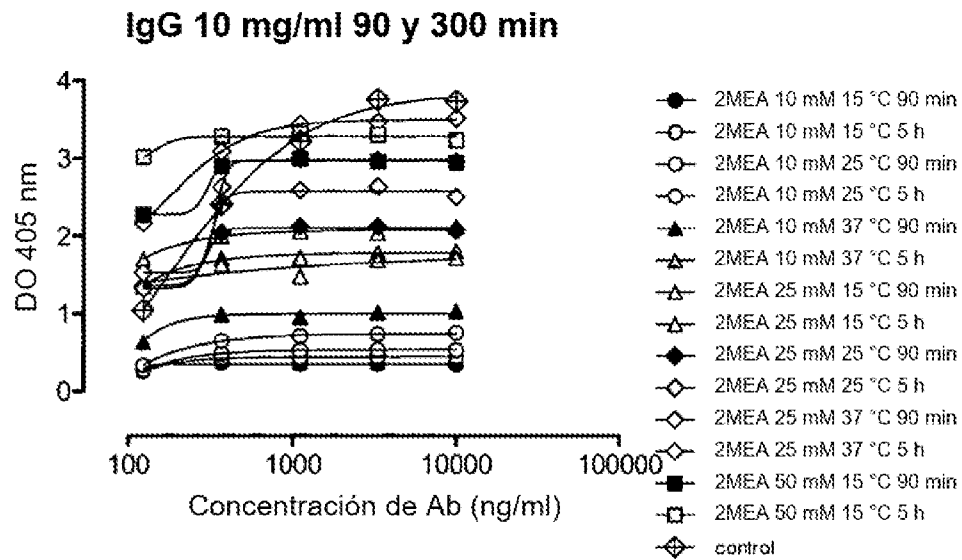


Figura 33 (continuación)

C



D

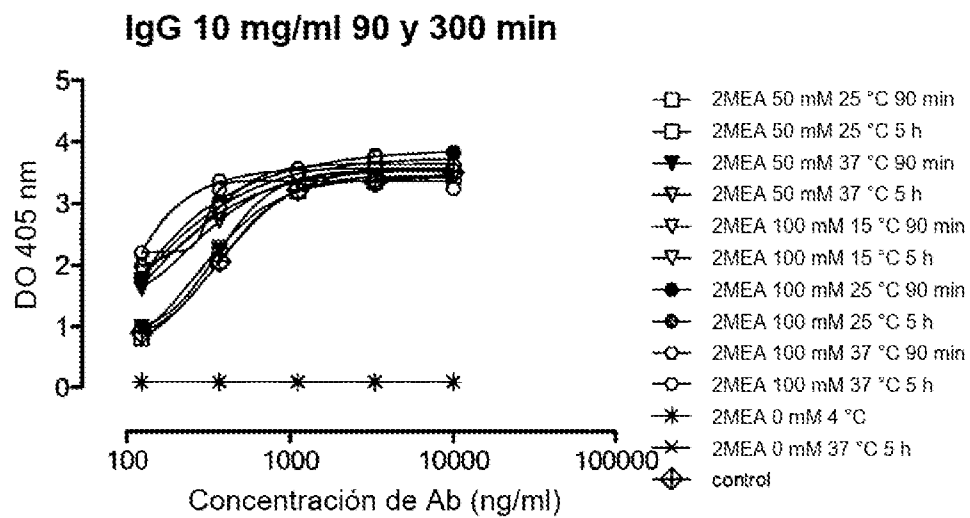
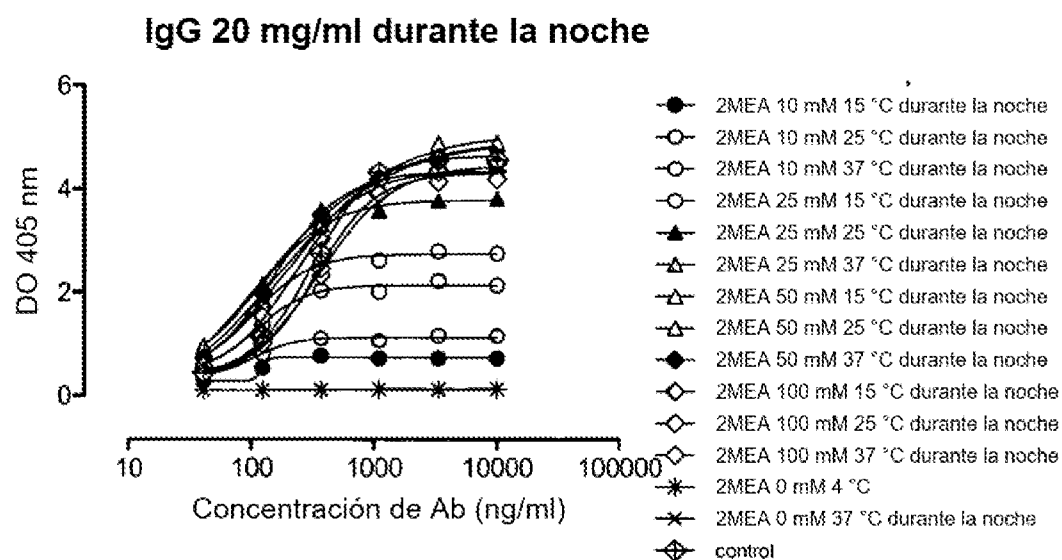


Figura 33 (continuación)

E



F

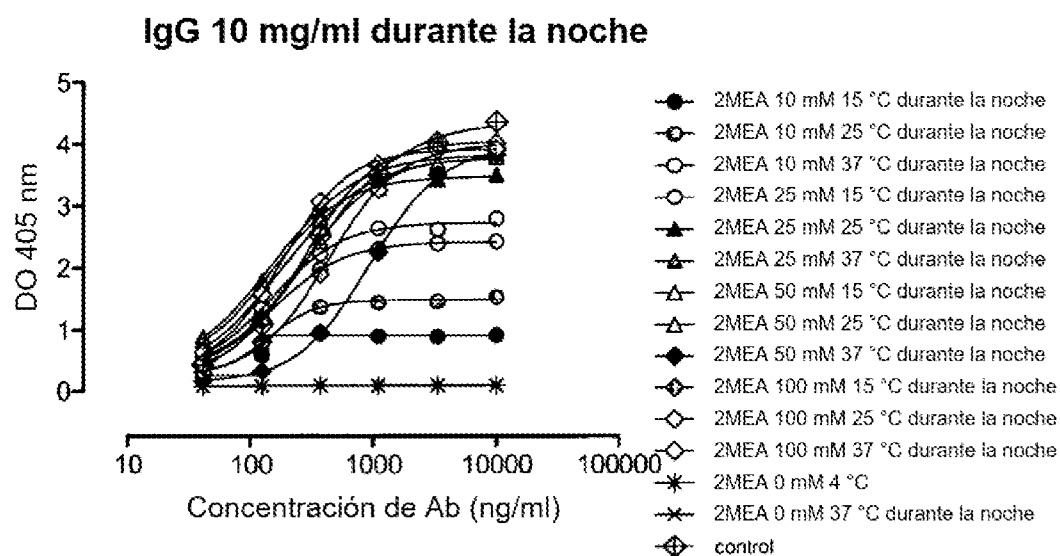
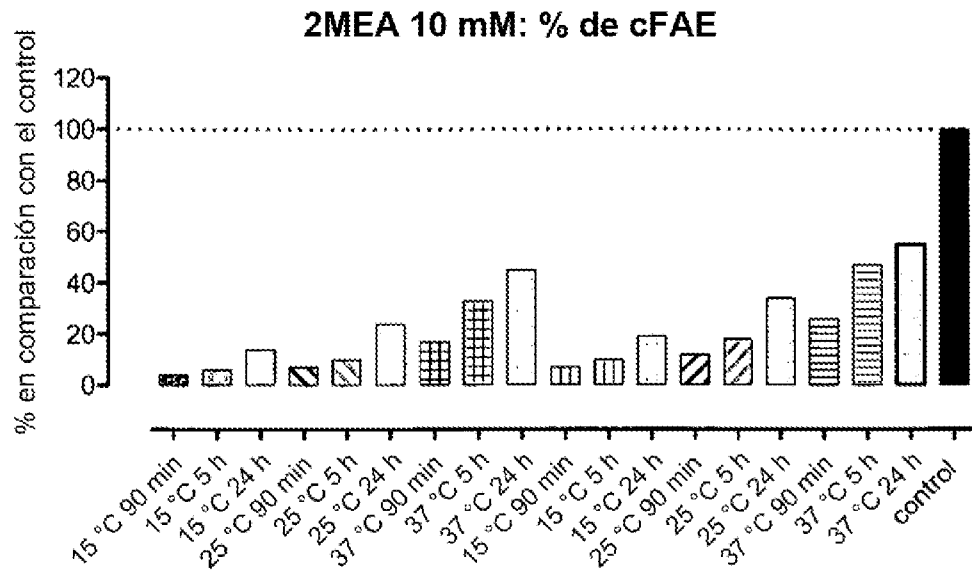


Figura 34

A



B

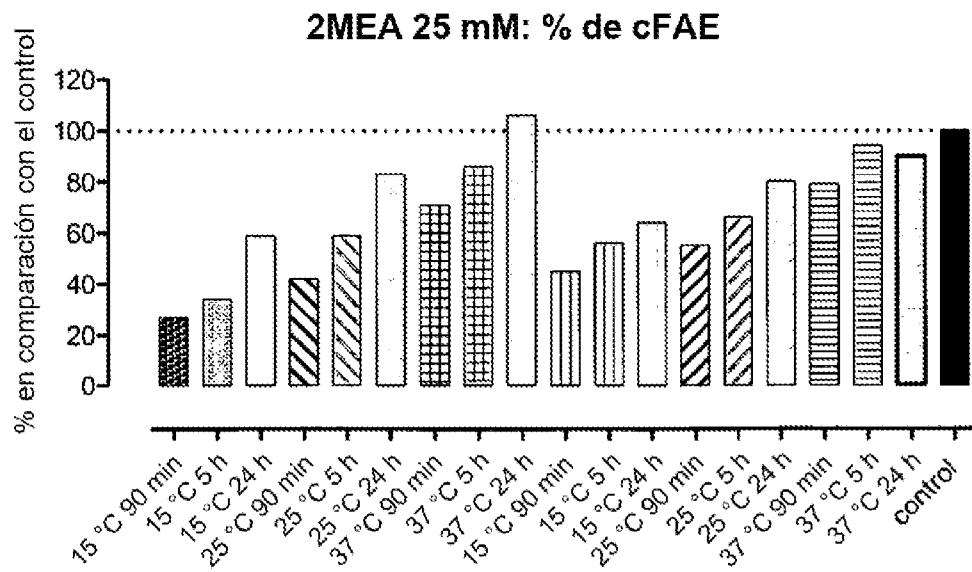
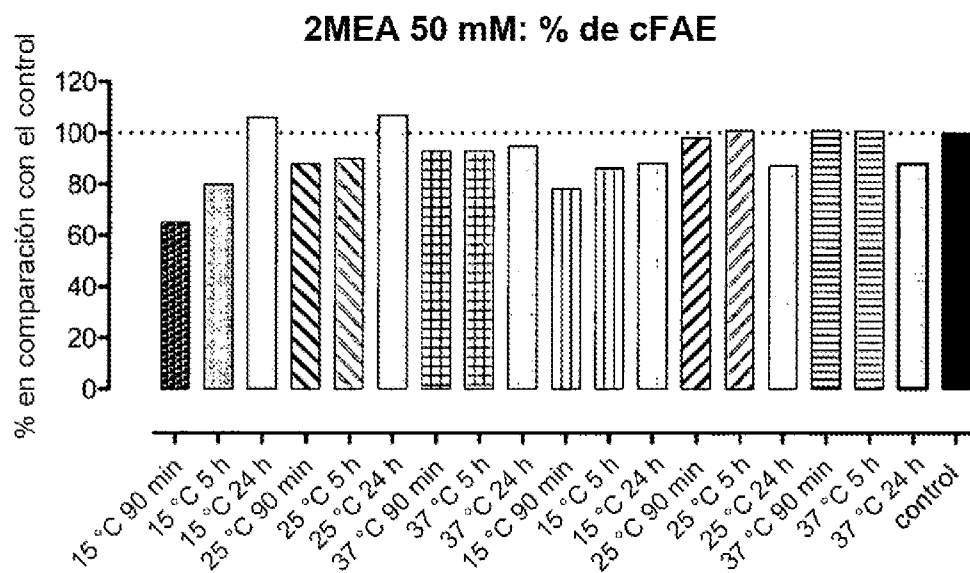


Figura 34 (continuación)

c



d

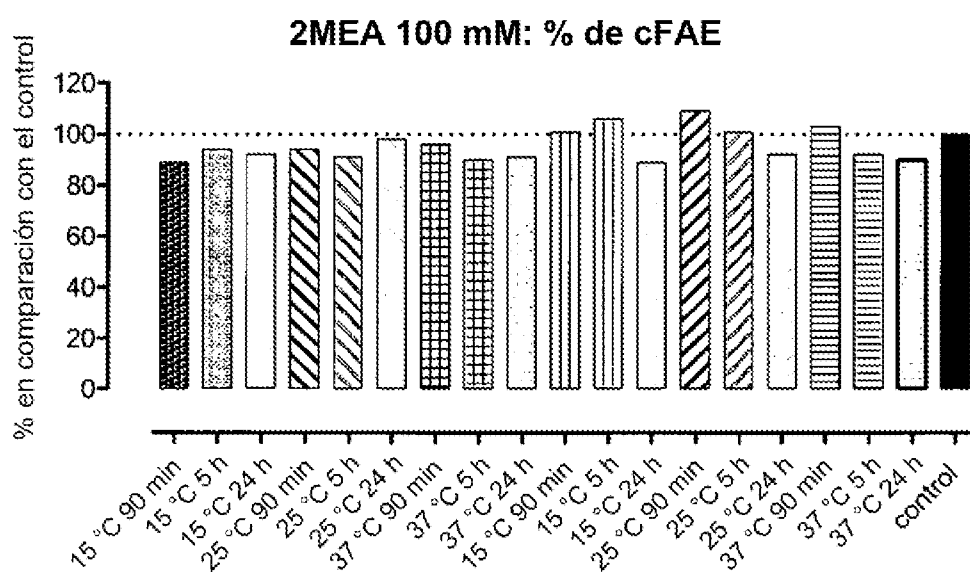
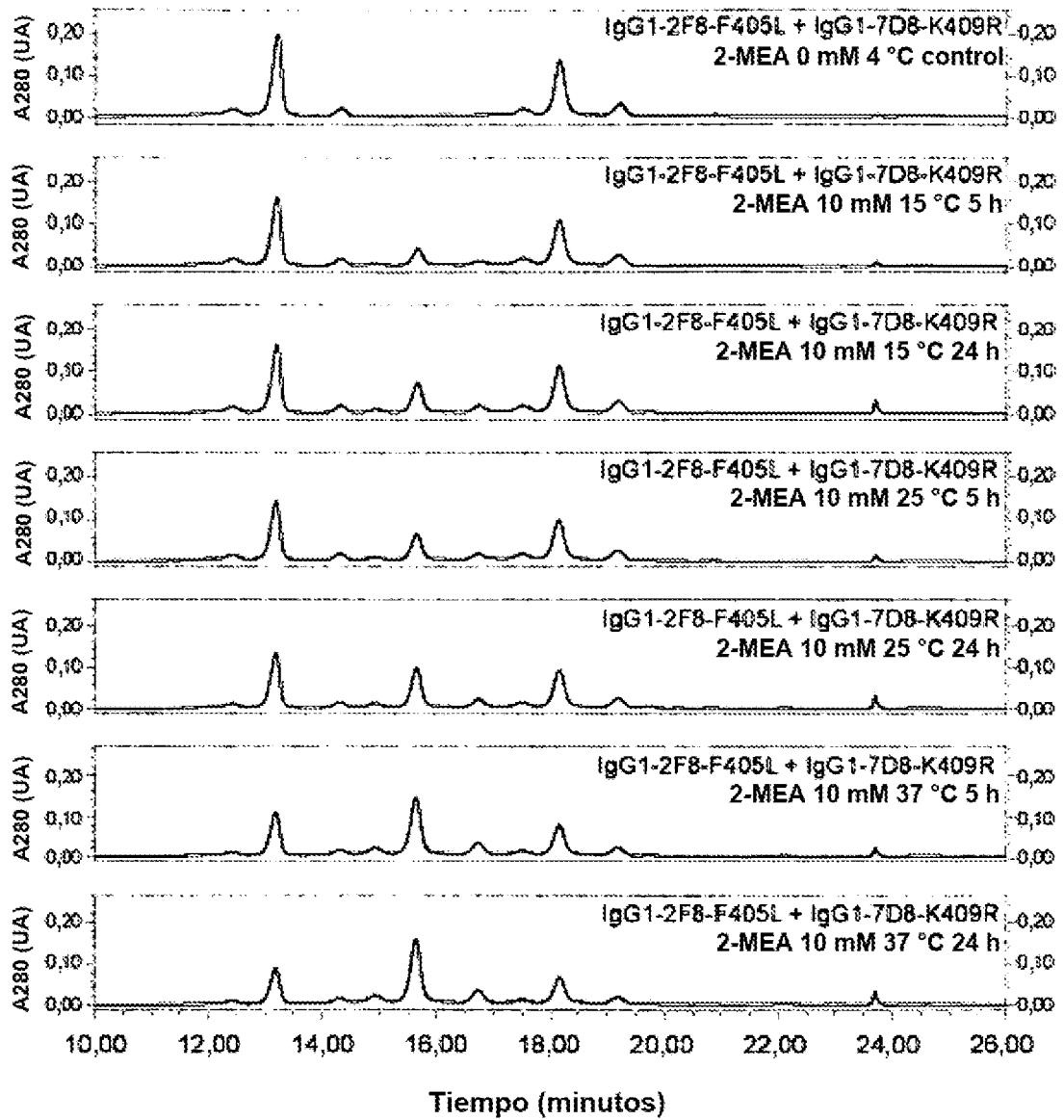
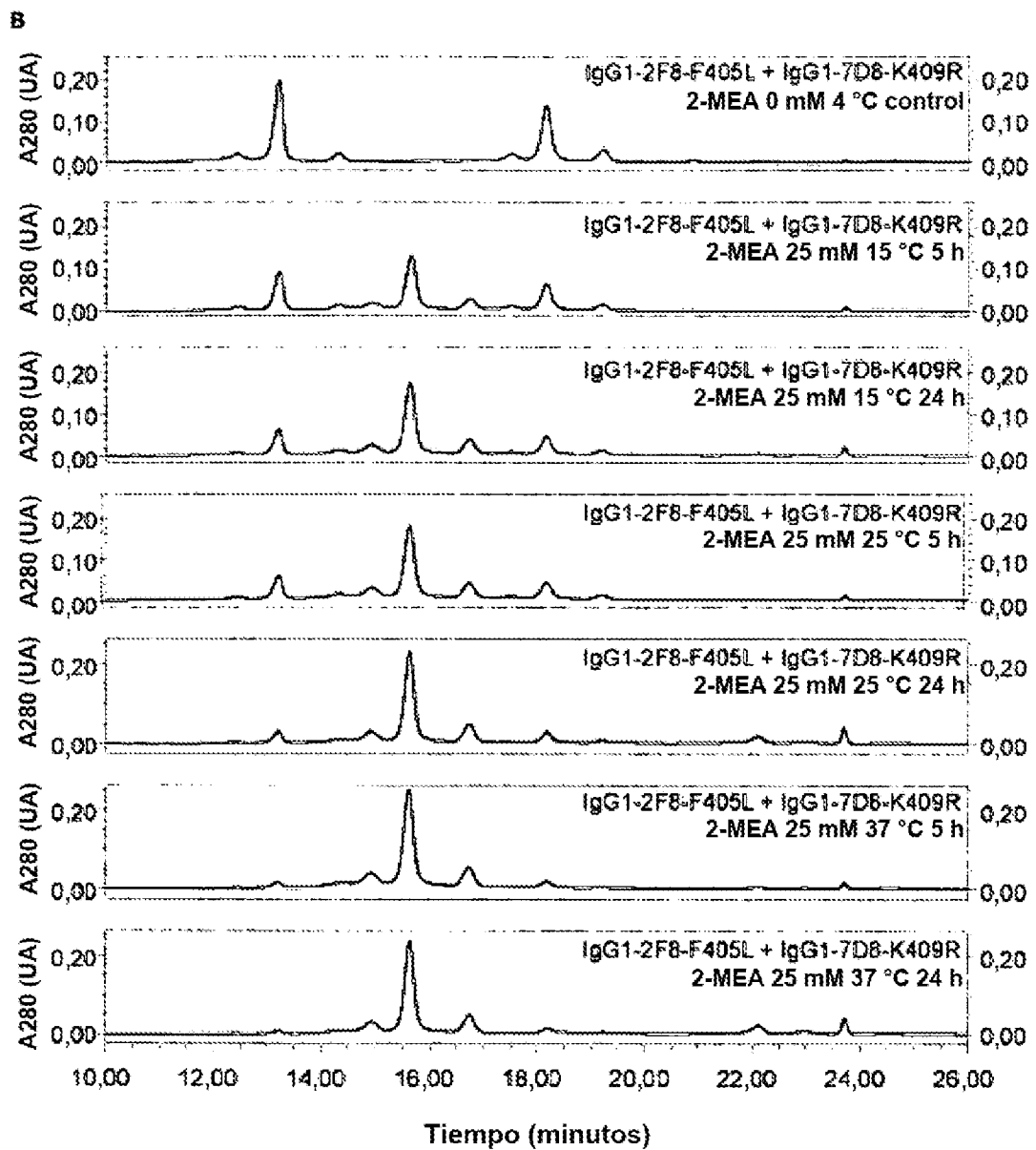
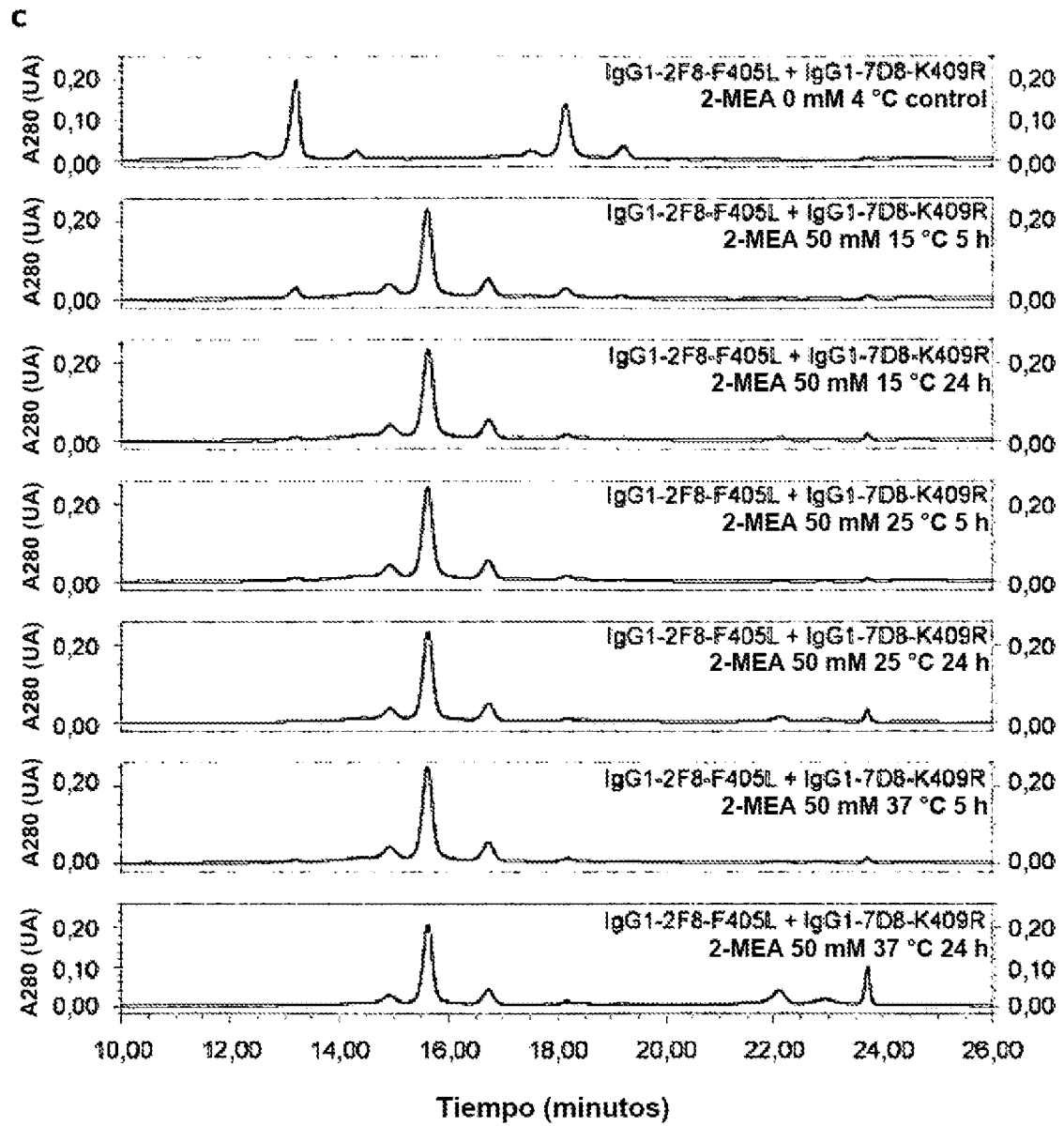


Figura 35

A







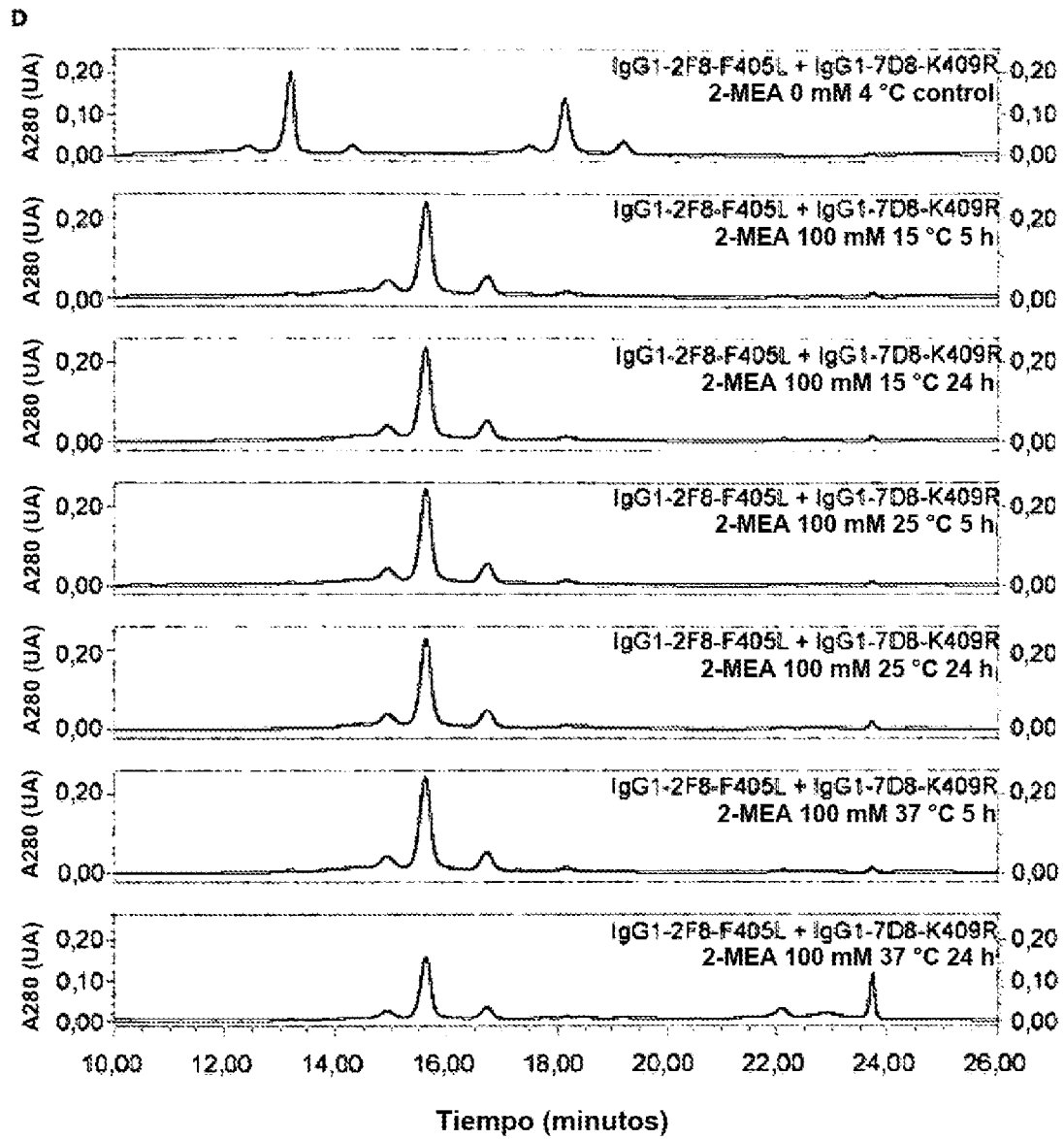
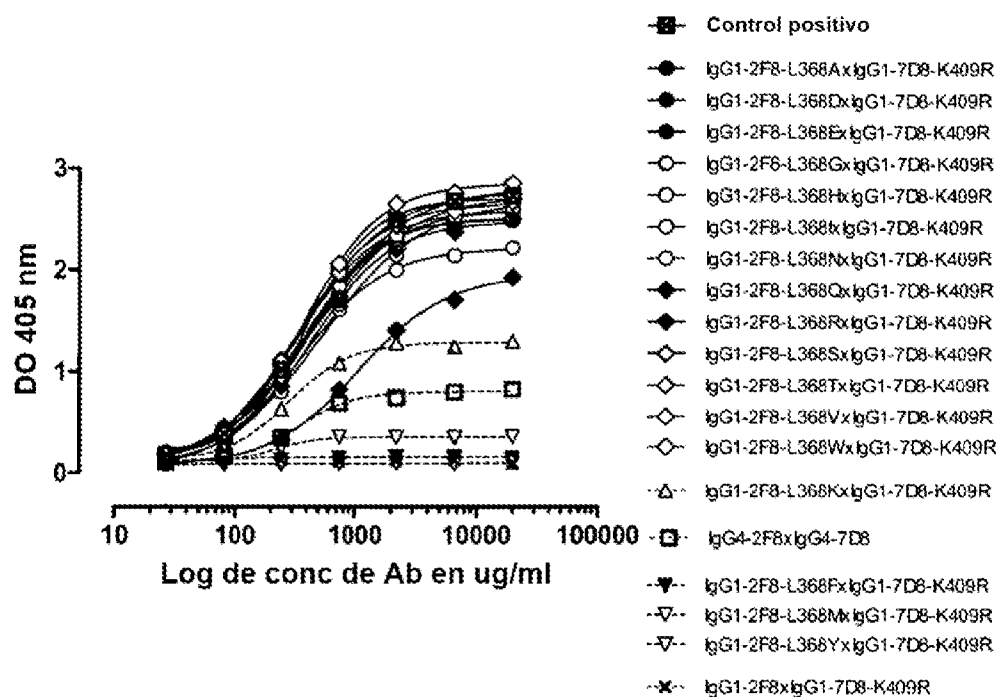


Figura 36

A



B

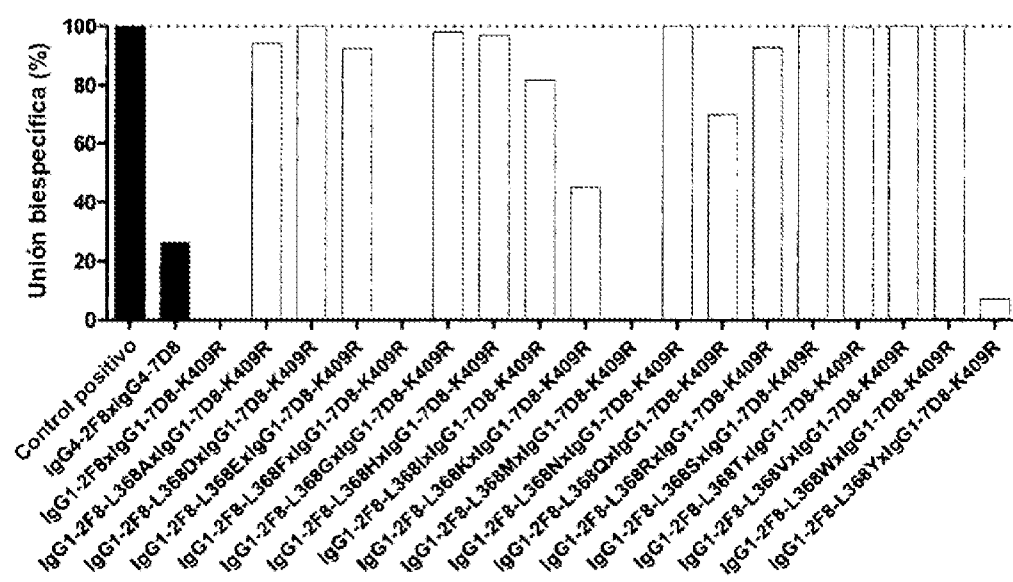
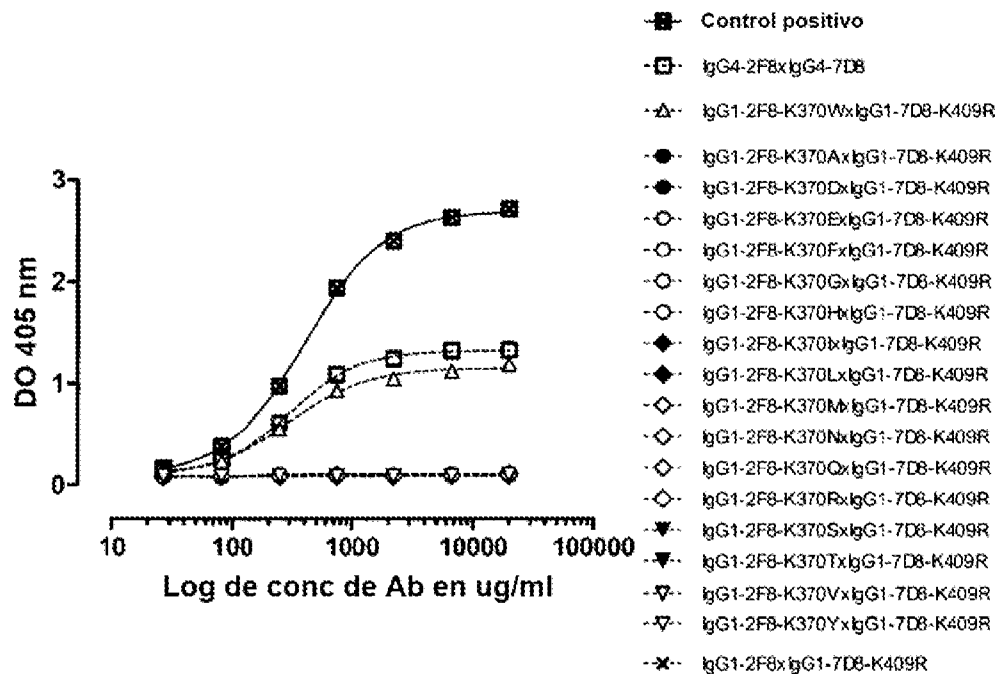


Figura 37

A



B

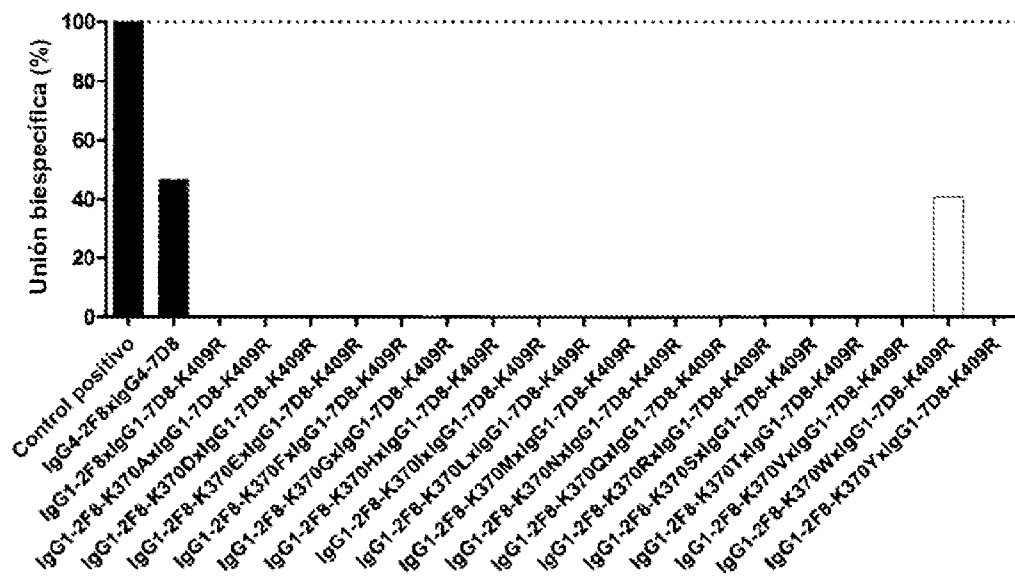
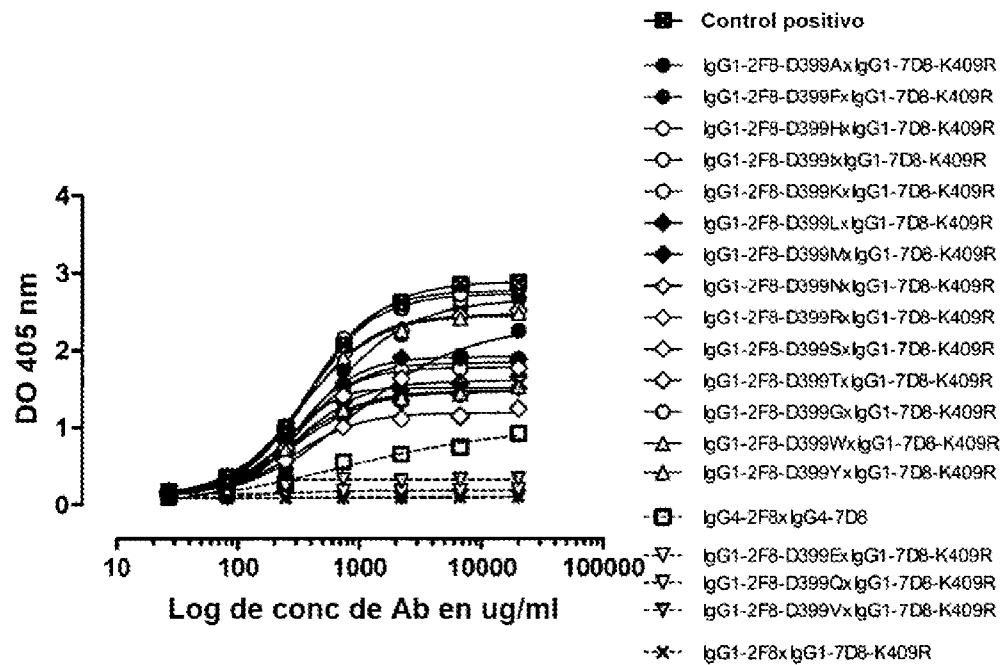


Figura 38

A



B

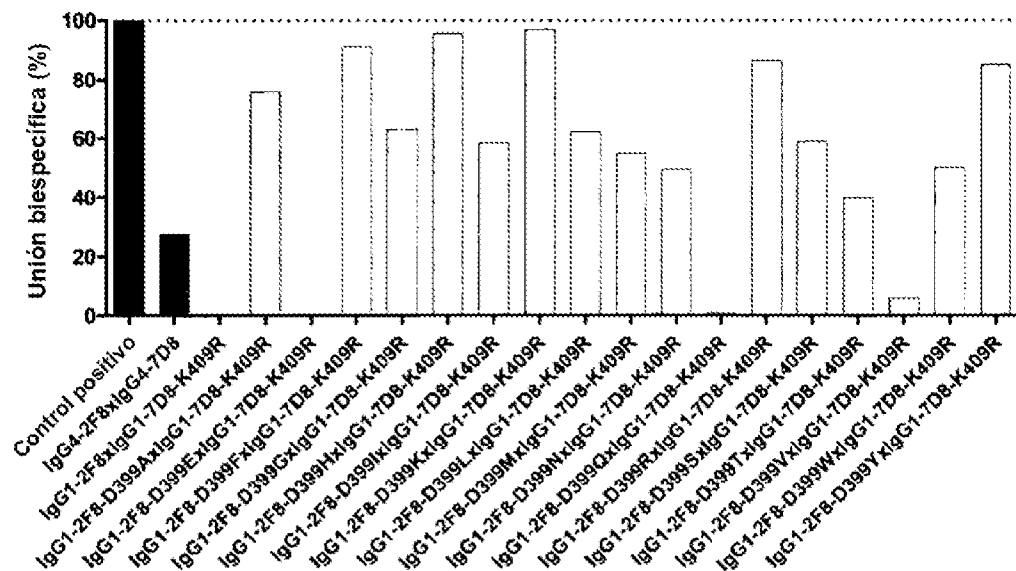


Figura 39

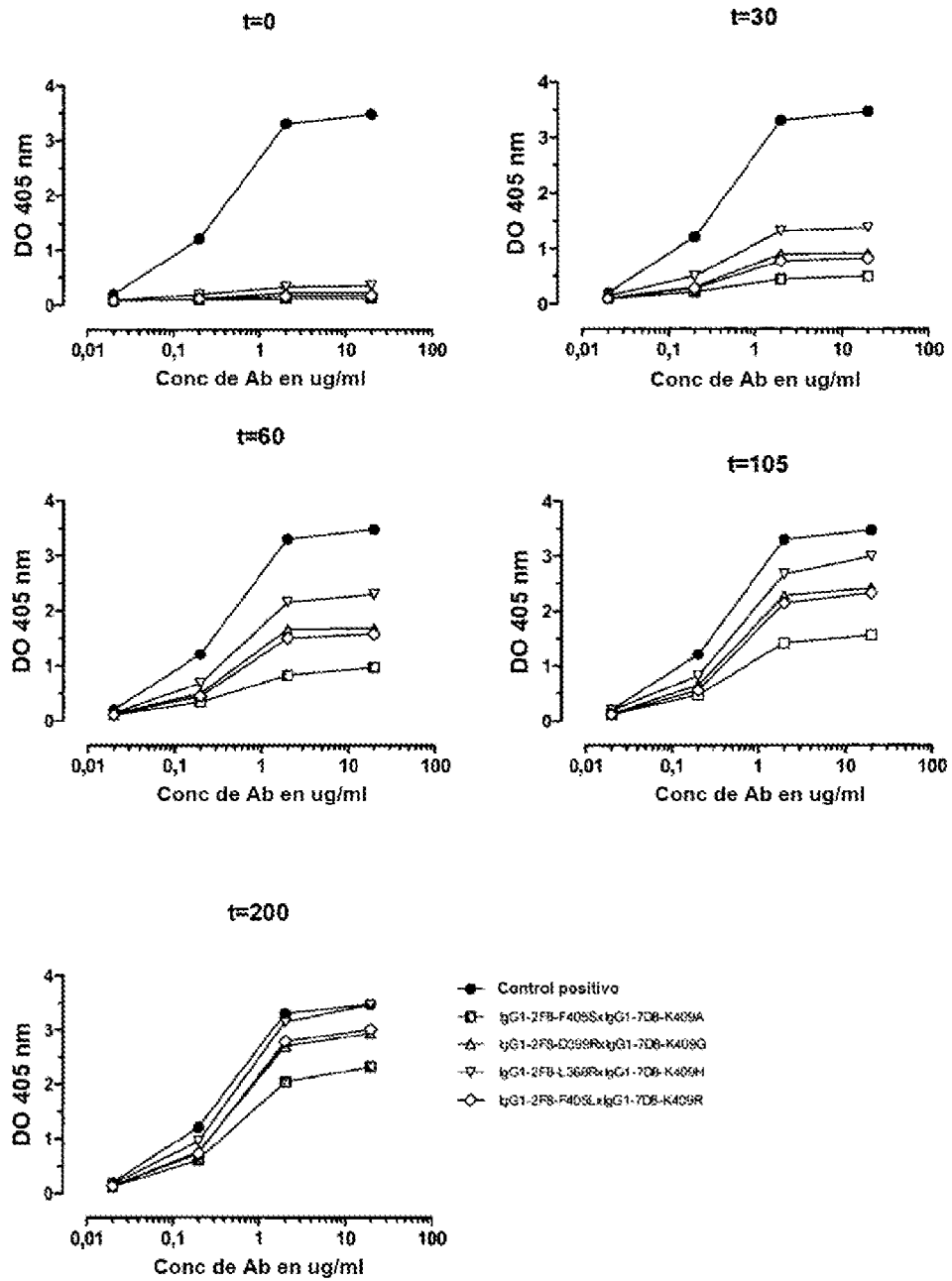


Figura 40

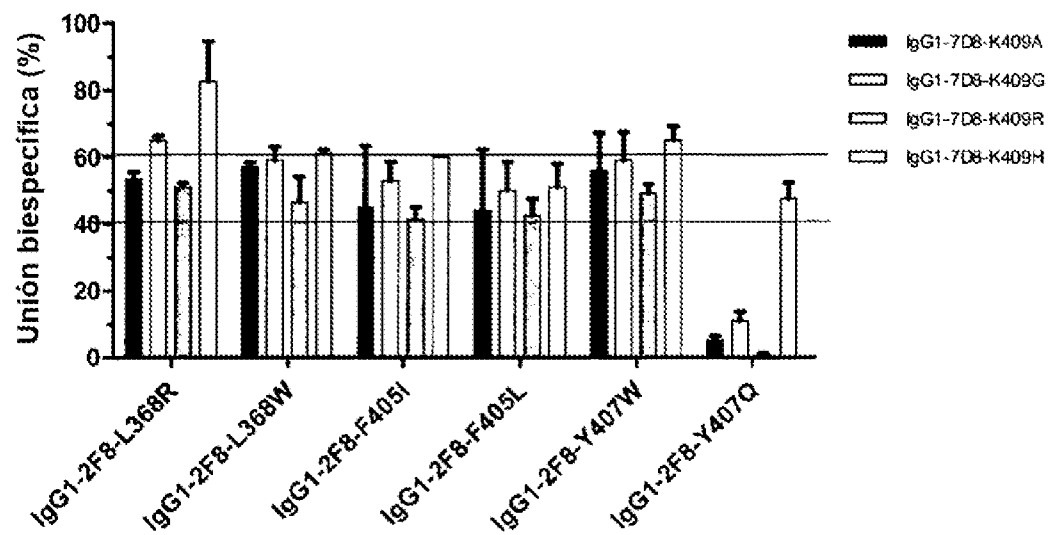


Figura 41

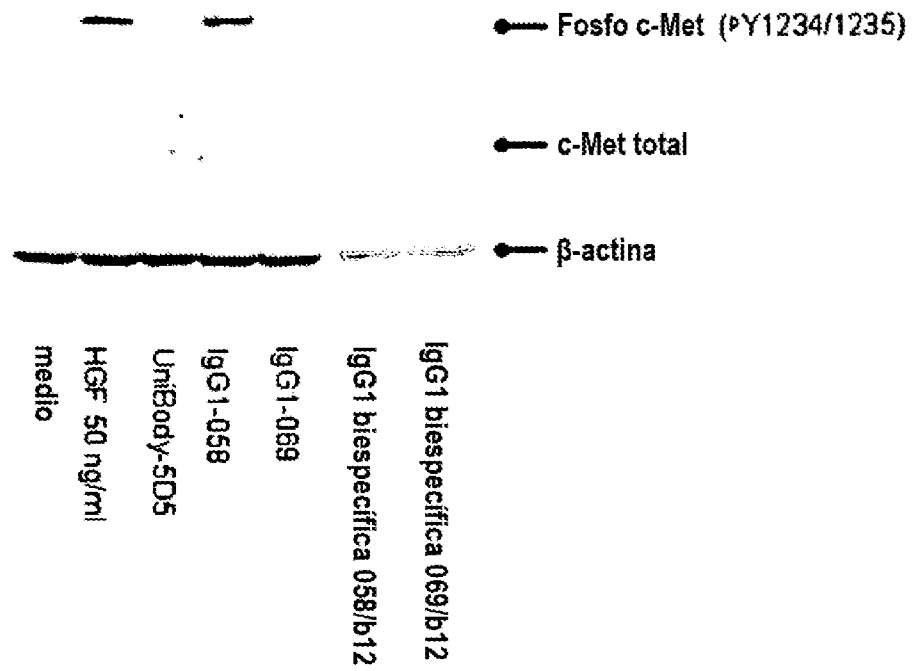


Figura 42

Ensayo de proliferación de NCI-H441

Incubación de 7 días [mAb] 10 µg/ml

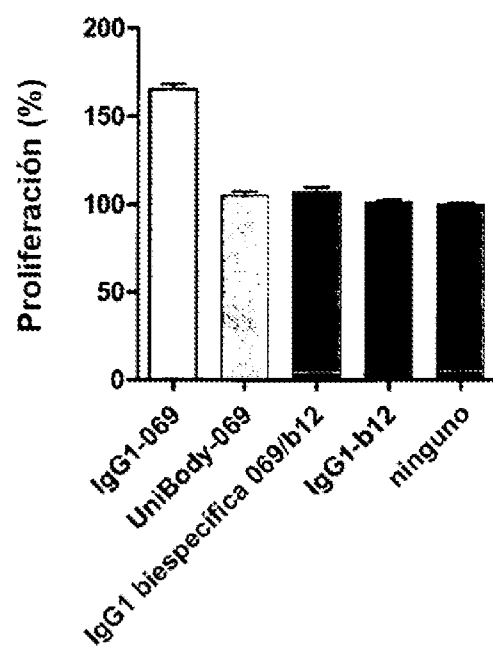
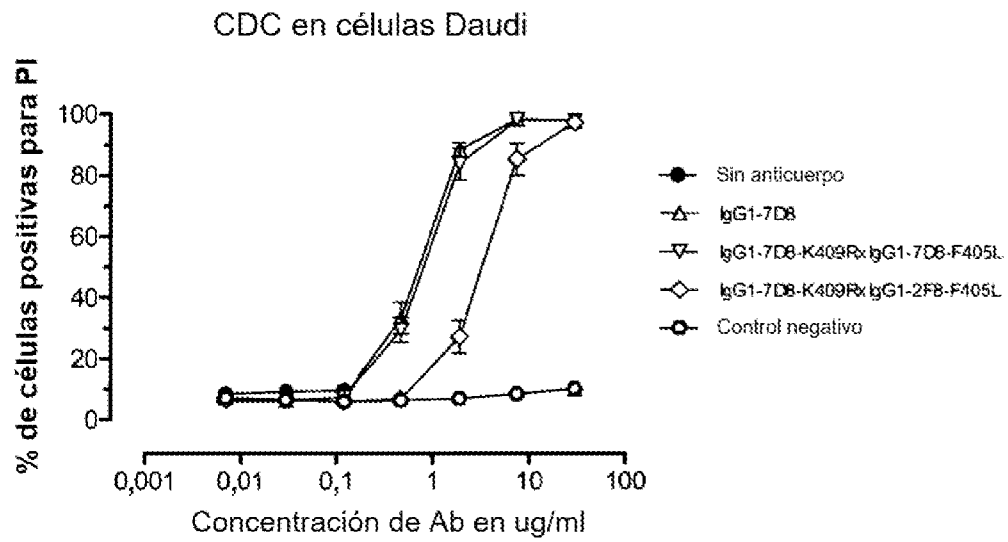


Figura 43

A



B

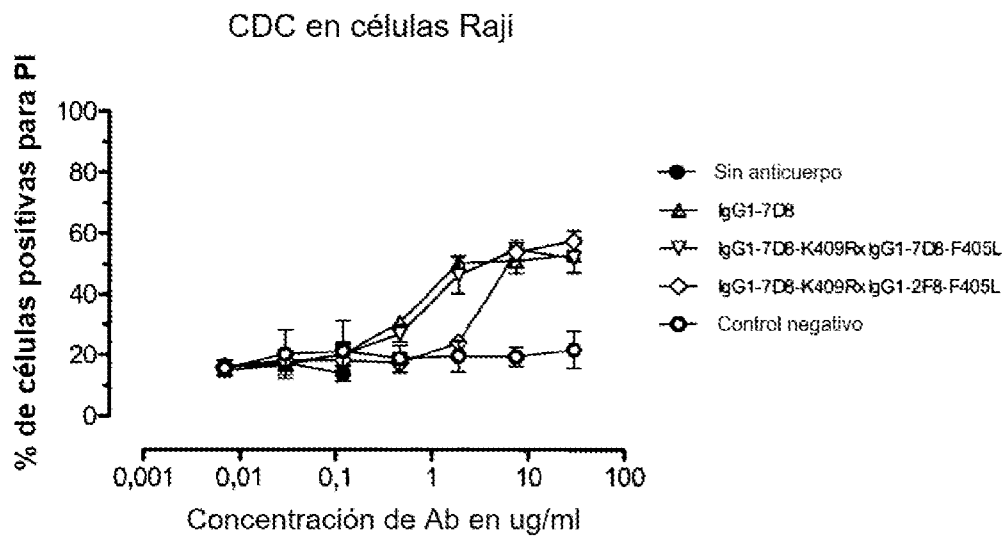


Figura 44

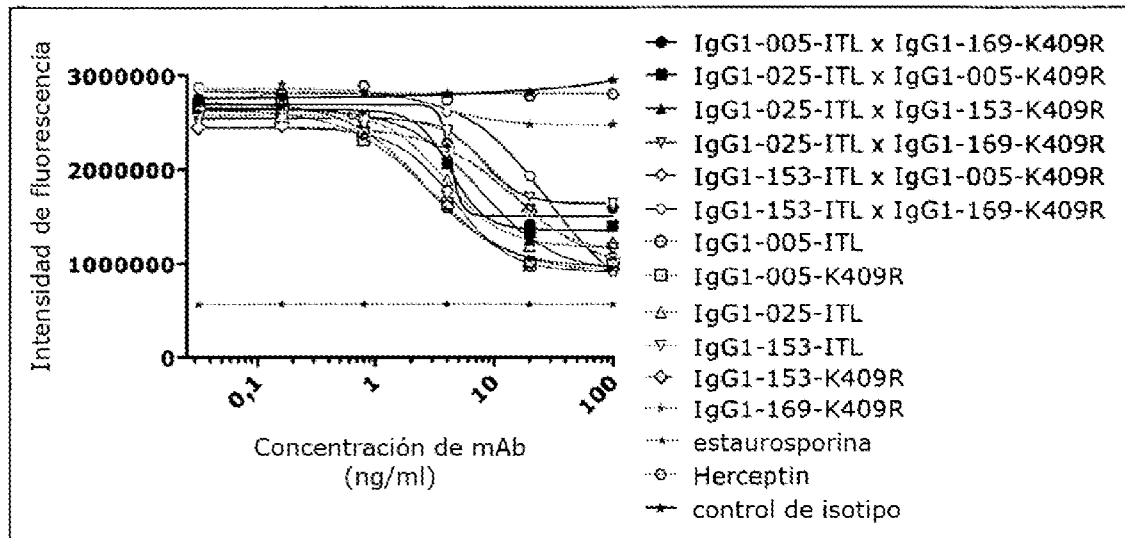


Figura 45

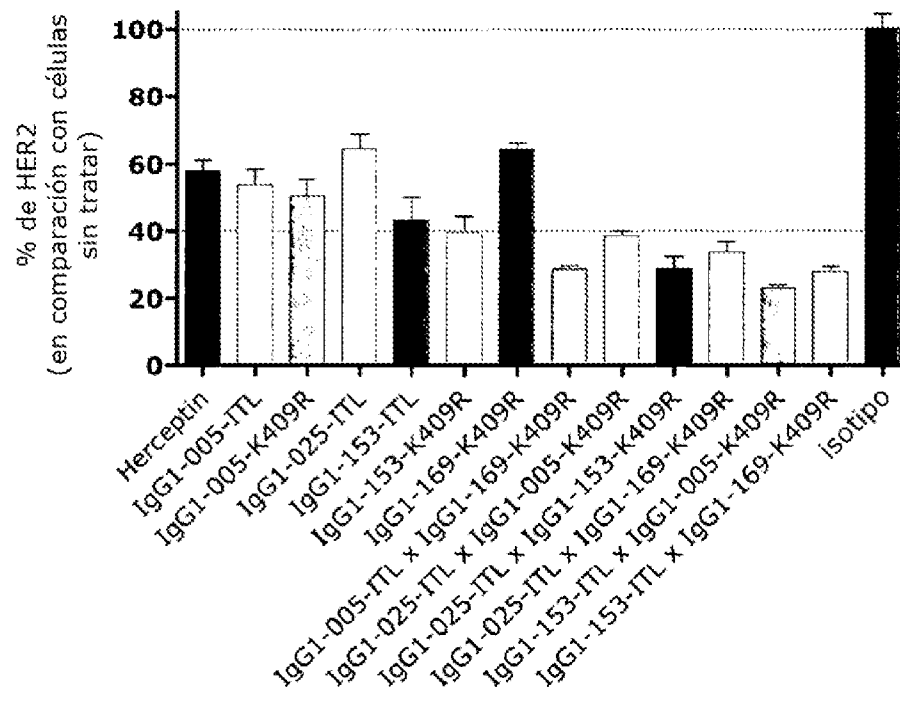
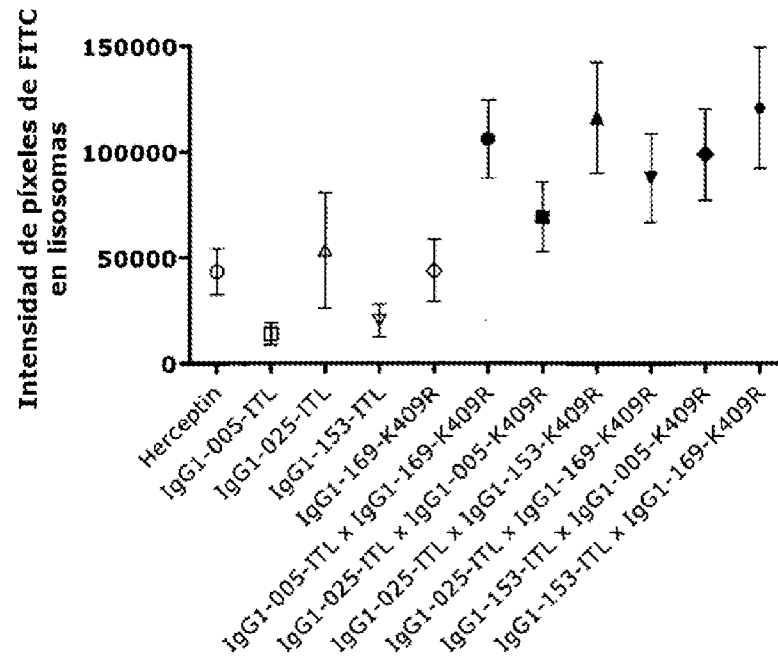


Figura 46

A



B

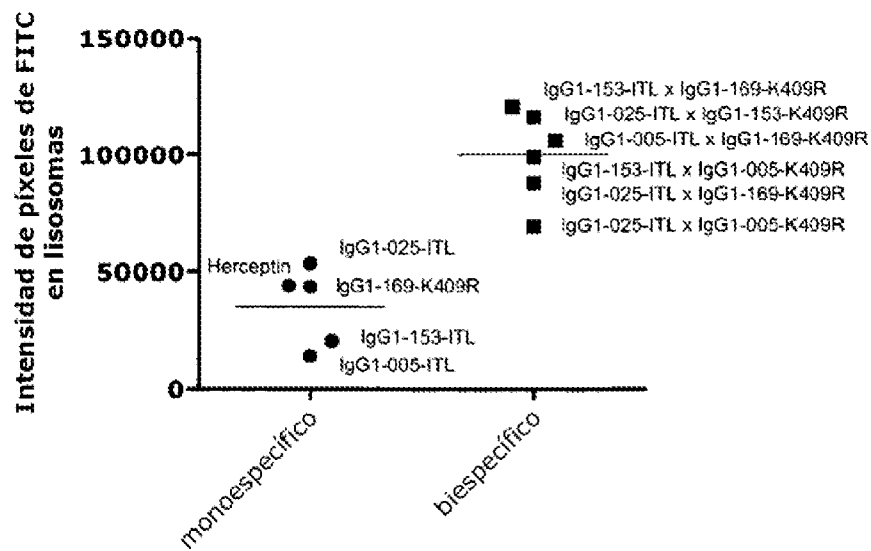


Figura 47

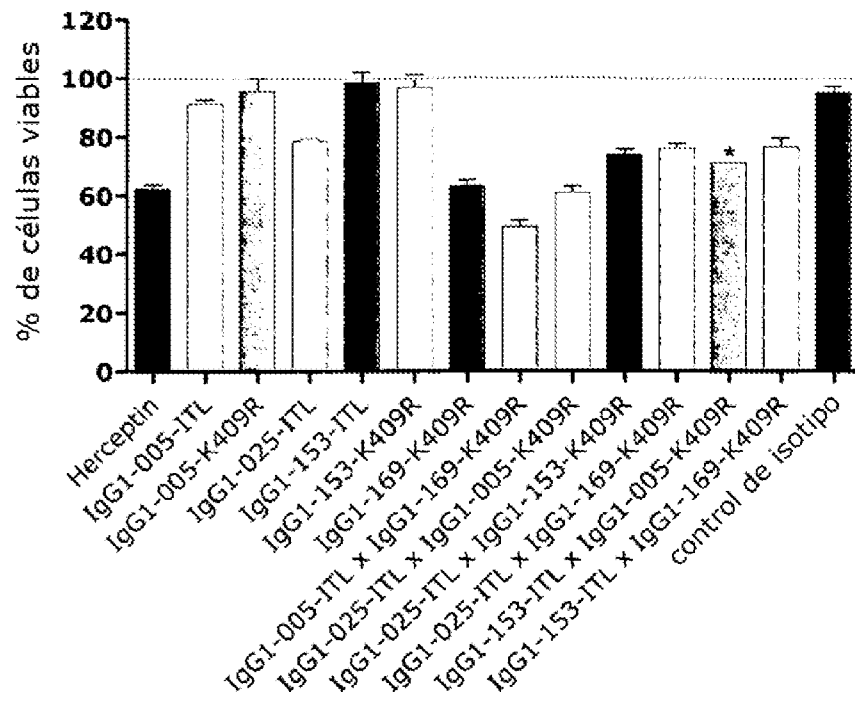


Figura 48

A

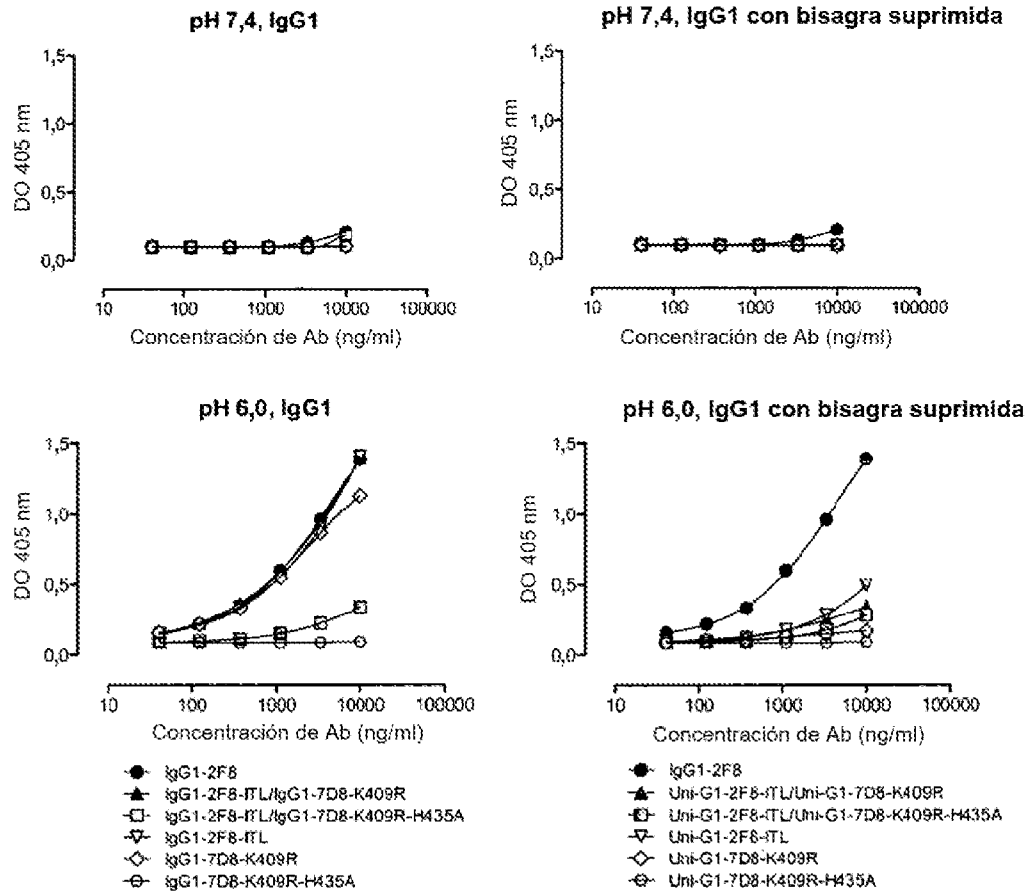


Figura 48 (continuación)

B

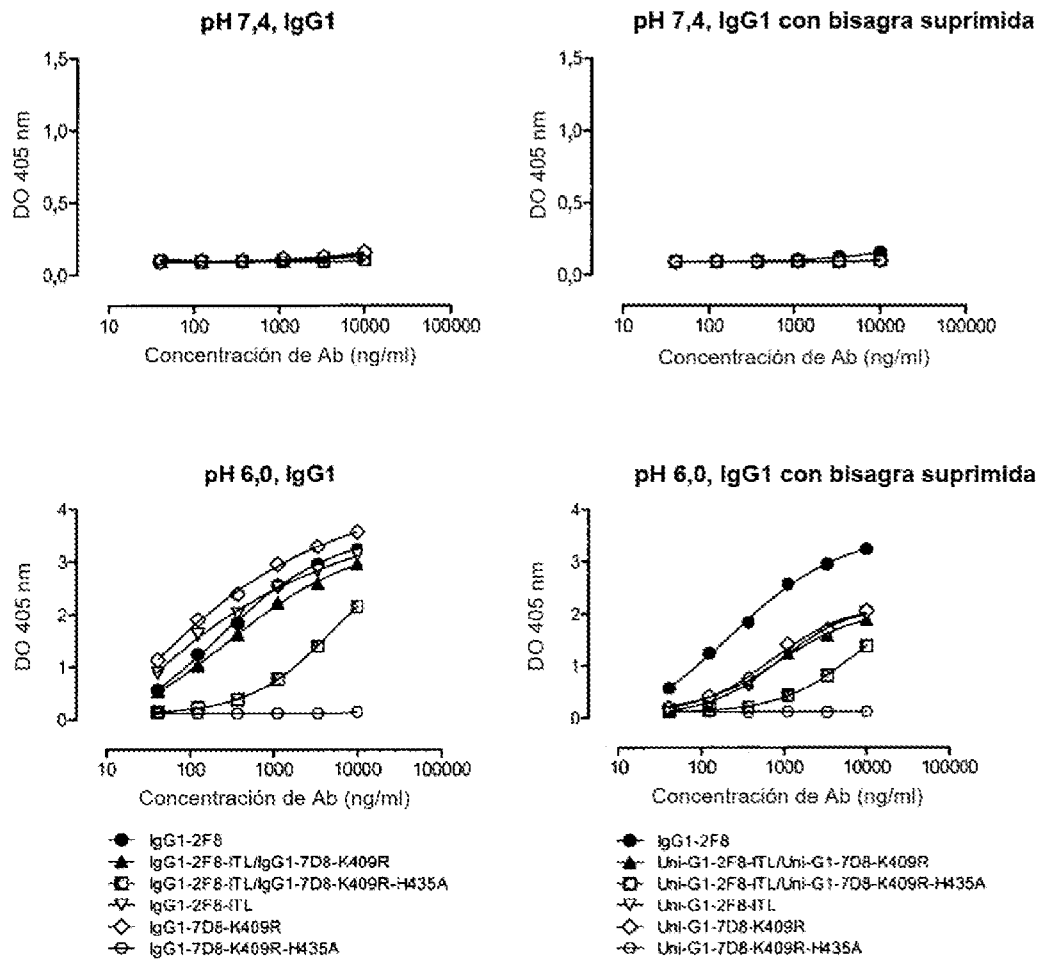


Figura 49

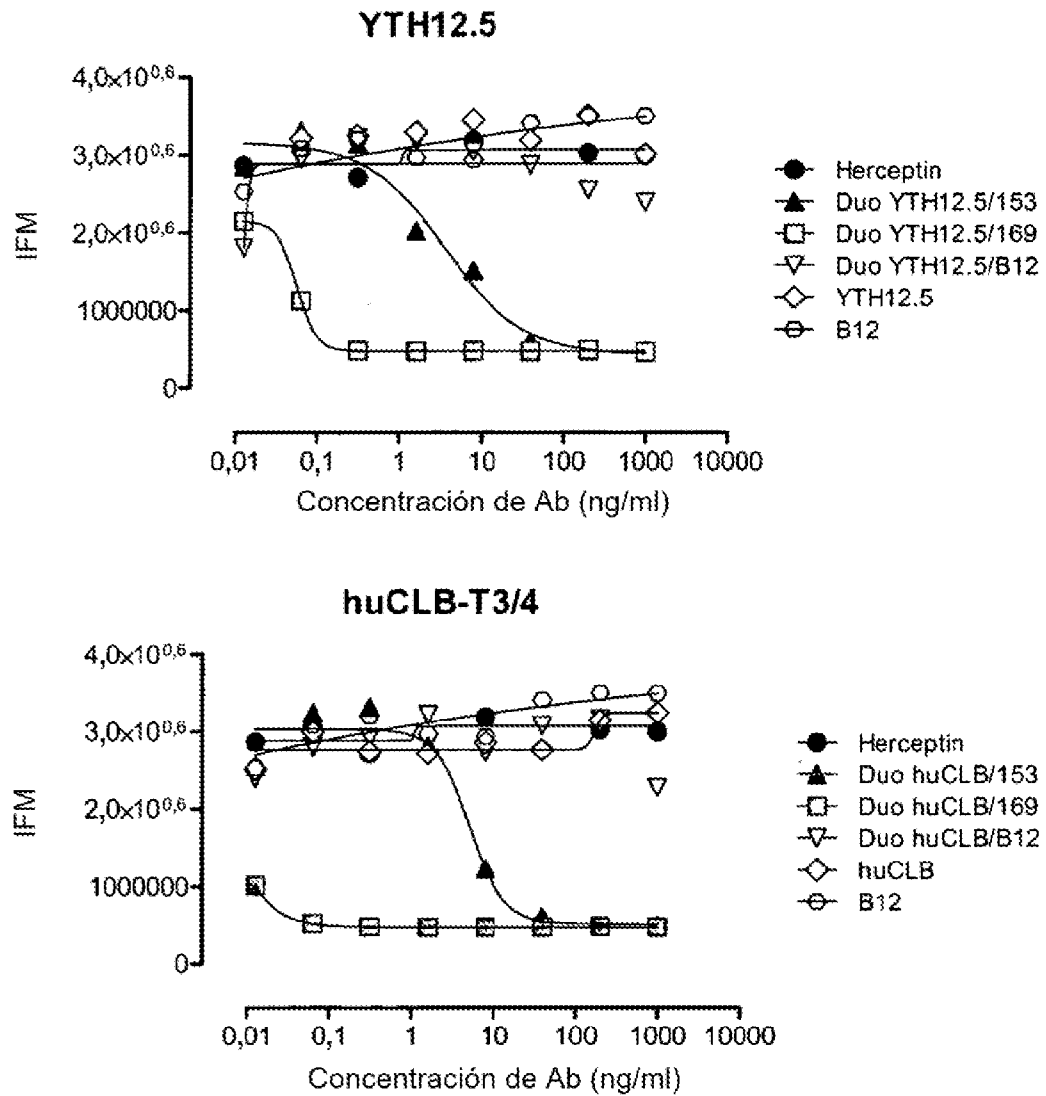


Figura 49 (continuación)

